



Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Universidade Nova de Lisboa

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE METALOPROTEINASES DE PARASITAS TRIPANOSOMATÍDEOS

Karina Pires de Sousa

Dissertação apresentada no âmbito do
VI Mestrado em Ciências Biomédicas,
para a obtenção do grau de Mestre.

Junho 2013



Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Universidade Nova de Lisboa

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE METALOPROTEINASES DE PARASITAS TRIPANOSOMATÍDEOS

Karina Pires de Sousa

Orientação: Inv. Dr. Marcelo Sousa Silva

Co-orientação: Prof. Dr. Hugo Alexandre Oliveira Rocha

Dissertação apresentada no âmbito do VI Mestrado em Ciências Biomédicas,
para a obtenção do grau de Mestre.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Programa de Cooperação Bilateral Portugal-Brasil,
financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT - Portugal) e a Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes – Brasil).

Junho 2013

*“Nothing happens in contradiction to nature, only in
contradiction to what we know of it.
And that’s a place to start.”*

The X-Files. Herrenvolk - 4x01 (1996)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, hoje e sempre, ao meu Pai, à minha Mãe e à minha Irmã. Pelo seu inesgotável amor incondicional, pela aventura de crescer juntos, de construir o futuro passo a passo e sempre sem perder de vista os valores verdadeiros: aqueles que dão significado à Vida. Vocês são o verdadeiro exemplo, os verdadeiros heróis, o verdadeiro amor. Sem vocês nunca teria chegado a ser nada do que hoje sou.

Ao professor, orientador e amigo, Marcelo Sousa Silva, por me permitir o extremo privilégio da liberdade para errar e aprender. Pela sua persistência em fazer de mim não apenas uma melhor profissional, mas também uma melhor pessoa. Pela tranquilidade com que me impulsiona a dar, a cada dia, o melhor de mim. Muito obrigada.

Ao professor e co-orientador, Hugo Oliveira Rocha pelo caloroso acolhimento na sua equipa, pela orientação preciosa e enérgica que me deu num ambiente totalmente novo, pela transmissão tranquila dos seus conhecimentos, e pelo seu sorriso sempre pronto, sempre valioso e sempre importante nos momentos de dúvida.

Àqueles outros professores que, em diferentes alturas da minha vida, em diferentes áreas do Saber, me inculcaram o gosto pelo conhecimento e por fazer dele uma prática. Por me ensinarem, mais do que a encontrar respostas, a fazer as perguntas pertinentes. Por me exemplificarem que o verdadeiro Mestre é o que forma outros mestres, não o que tem mais alunos ou mais conhecimentos acumulados.

Às minhas estrelas, como sempre. Por acreditarem em mim, por sorrirmos e chorarmos juntos, por serem quem são na minha vida, e por me relembrares quem Eu sou quando os inevitáveis contratempos ameaçam fazer-me esquecer que nada o que valha a pena é fácil de conseguir. Vocês sabem que, longe ou perto, são vocês quem o meu coração abriga.

O meu sincero agradecimento a todos os BALB/c e CD1 que por esse Mundo fora nos apoiam altruisticamente nesta demanda que é a Ciência.

Resumo

Caracterização bioquímica de metaloproteínas de parasitas tripanosomatídeos

Karina Pires de Sousa

A identificação e caracterização de processos mediados por metaloproteínas de uma grande variedade de eucariotas está a avançar rapidamente, tanto a nível molecular como celular – e os muitos papéis que as proteases desempenham nestes organismos estão a ser trazidas para o foco. As metaloproteínas de matriz executam tarefas de “housekeeping” comuns a muitos organismos, bem como funcionam a um nível muito mais específico no ciclo de vida dos parasitas, por exemplo. Papéis pivotais foram propostos em diferentes processos, como invasão e egressão de células, enquistação e desenquistação, catabolismo de proteínas, diferenciação, progressão do ciclo celular, citoaderência, e ainda estimulação e evasão ao sistema imune.

No presente estudo, é feito o reconhecimento e a caracterização de metaloproteínas de dois diferentes extractos de parasitas protozoários: *Trypanosoma brucei* e *Leishmania infantum*. A classificação de metaloproteases foi obtida a partir da inibição diferencial da actividade destas proteases sobre diferentes substratos (gelatina e caseína), tendo sido efectuada uma prospecção de inibidores selectivos com potencial para serem empregues em novas estratégias de quimioterápica contra estes agentes. Adicionalmente, é feito um estudo bioinformático sobre uma metaloproteína comum aos parasitas aqui abordados, alargando o estudo a outros organismos relacionados.

Os resultados obtidos demonstram a presença de metaloproteínas capazes de degradar proteínas de matriz em ambos os extractos estudados, sendo possível inibir a sua actividade com concentrações relativamente moderadas de inibidores. Além disso, sugerem que em todos os eventos patológicos abordados neste estudo, a presença de metaloproteínas activas é estável no seu ciclo de vida e provavelmente na progressão da patologia provocada pelos diferentes agentes em estudo. A análise de todos os resultados e observações poderá possivelmente levar à identificação e integração de elementos comuns nos processos de invasão celular e progressão parasitária aqui abordados. Por essa razão, a compreensão destas interacções permanece um desafio importante.

Palavras-chave: metaloproteínas de matriz, matriz celular, protozoários parasitas, inibidores de metaloproteínas.

Abstract

Biochemical characterization of metalloproteases from trypanosomatide parasites

Karina Pires de Sousa

The identification and characterization of metalloprotease-mediated processes from a variety of eukaryotes is progressing at a rapid rate, both at the molecular and cellular levels – and the many roles that proteases play in these organisms are coming into focus. Matrix metalloproteinases carry out housekeeping tasks common to many eukaryotes, as well as functioning at a much more specific level in parasitic life cycles, for instance. Central roles have been proposed in diverse processes, such as cell invasion and egress, encystation, excystation, catabolism of proteins, differentiation, cell cycle progression, cytoadherence, and both stimulation and evasion from immune responses.

In this study, a characterization of the metalloproteases from two different extracts is presented: *Trypanosoma brucei brucei* and *Leishmania infantum*. Classification into the metalloprotease class has been accomplished by means of differential inhibition of the activity of these proteases over different substrates (gelatin and casein), and a survey of selective inhibitors with potential use on new chemotherapeutical strategies against these agents was performed. Additionally, a bioinformatic study regarding a metalloprotease which is common to the parasites in study is conducted, and branches out this study to related organisms.

The results herein presented demonstrate the presence of metalloproteases capable of degrading matrix proteins in all of the extracts studied, and that their activity can be inhibited with moderate concentrations of inhibitors. Furthermore, the results suggest that in all the pathological events discussed here, the presence of active metalloproteases is indeed stable to their life cycles and in the progression of the pathology caused by the diverse biological agents in study. The analysis of all the results and observations may possibly lead to the identification and integration of common elements in the processes of cellular invasion and parasitic progression explained here. For that reason, the understanding of these interactions remains an outstanding challenge.

Keywords: matrix metalloproteinases, cellular matrix, protozoan parasites, metalloproteinase inhibitors.

Índice

1. Revisão da Literatura	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Metaloproteínas e Metaloproteinases de Matriz	1
1.2.1 Bioquímica das Metaloproteinases	2
1.2.1.1 Bioquímica Estrutural	2
1.2.1.2 Regulação da Expressão das Metaloproteinases de Matriz	5
1.2.1.2.1 Regulação Transcriptional e Pós-Transcriptional	7
1.2.1.2.2 Inibidores Endógenos	8
1.2.1.2.3 Regulação catabólica e clearance	10
1.2.1.2.4 Compartimentalização	11
1.2.2 Patofisiologia geral das metaloproteinases	11
1.3 Relevância das metaloproteinases em doenças causadas por tripanosomatídeos	14
1.3.1 Tripanosomose Africana	14
1.3.2 Leishmanioses	19
1.4 Inibição da actividade das metaloproteinases	23
1.4.1 Inibidores Clássicos	25
1.4.1.1 Agentes Quelantes	25
1.4.1.2 Antibióticos	25
1.4.2 Outros Inibidores	26
1.4.2.1 Anticorpos e Macroglobulinas	26
1.4.2.2 Inibidores Sintéticos	26
1.4.2.3 Outros compostos	27
1.5 Ensaio de Actividade das Metaloproteinases	28
1.5.1 Zimografia	29
1.5.2 Outros métodos	31
2. Objectivos	34
3. Materiais e Métodos	35
3.1 Obtenção de extractos de parasitas	35
3.1.1 Extracto de <i>T. b. brucei</i>	35
3.1.2 Extracto de <i>L. infantum</i>	35
3.2 Determinação da concentração dos extractos	36
3.3 Perfil electroforético das proteínas	36
3.4 Zimografia para metaloproteinases	37
3.4.1 Ensaio de Actividade	37
3.4.2 Ensaio de Inibição	38
3.5 Análise Bioinformática	38
3.5.1 Colecção de dados	39
3.5.2 Alinhamento	40
3.5.3 Pesquisa de Domínios Conservados	40
3.5.4 Análise Filogenética	40
3.5.5 Teste de selecção positiva	40

4. Resultados e Discussão	42
5. Conclusões	62
6. Perspectivas Futuras	65
7. Referências bibliográficas	67
Anexos	81

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Metaloproteínas de Matriz, os seus substratos, activadores endógenos e capacidade activadora	6
Tabela 2 – Mecanismo de acção e concentração de trabalho dos diferentes inibidores utilizados...	38
Tabela 3 – Resumo das informações relativas às sequências utilizadas para bioinformática	39
Tabela 4 – Concentração e massa de proteína utilizada em cada extracto em estudo	45
Tabela 5 – Percentagem de identidade entre as sequências da matrixina GP63 nos diferentes parasitas em estudo	56

Índice de Figuras

Figura 1 – Composição das MMP	2
Figura 2 – Pró-domínio das MMP	3
Figura 3 – Estrutura do domínio catalítico das MMP	4
Figura 4 – Controlo biológico das MMP	7
Figura 5 – Representação cristalográfica do complexo MMP-TIMP	9
Figura 6 – Identificação dos diferentes substratos das MMP	12
Figura 7 – Consequências patofisiológicas da produção e activação das MMP	13
Figura 8 – Aspectos morfológicos, ciclo de transmissão e incidência de infecções por <i>Trypanosoma brucei</i>	15
Figura 9 – Alterações na barreira hematoencefálica durante THA	18
Figura 10 – Aspectos morfológicos, epidemiológicos e ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	20
Figura 11 – Representação esquemática dos potenciais alvos na inibição das MMP	24
Figura 12 – MMP e um inibidor sintético	27
Figura 13 – Aspectos microscópicos da purificação dos parasitas da espécie <i>T. b. brucei</i> a partir de sangue total de murganho	42
Figura 14 – Perfil electroforético em condições desnaturantes dos extractos utilizados neste trabalho	44
Figura 15 – Perfil zimográfico dos extractos utilizados neste trabalho	46
Figura 16 – Sumário gráfico do alinhamento de 40 sequências para as 4 espécies de interesse	53
Figura 17 – Excerto do alinhamento múltiplo das 40 sequências prospectadas	54
Figura 18 – Estrutura e superfície topográficas da Leishmanolisina	56
Figura 19 – Resultado textual da pesquisa de domínios conservados nas sequências estudadas	58
Figura 20 – Análise filogenética molecular pelo método de <i>Maximum Likelihood</i>	59

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Concentração mínima, em mol/L, necessária para obter 100% de inibição da actividade gelatinolítica de mmp presentes nos extractos em estudo	49
Gráfico 2 – Concentração mínima, em mol/L, necessária para obter 100% de inibição da actividade caseinolítica de metaloproteínas presentes nos extractos em estudo	51

Lista de Abreviaturas

BBB	<i>Blood/brain barrier</i> – Barreira hematoencefálica
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina bovina sérica
CSF	<i>Cerebral spine fluid</i> – Fluido cérebro-espinhal
DEAE	Dietilaminoetanol
DTT	Ditiotreitol
ECM	<i>Extracellular matrix</i> – Matriz Extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio Enzimático de Imunoabsorção
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Direção dos Medicamentos e Alimentação
FTIC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de fluoresceína
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> – Transferência de Energia de Ressonância da Fluorescência
GP63	Glicoproteína 63 (leishmanolisina)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEMA	2-hidroxietilmetacrilato
IFN- γ	Interferão gama
<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase(s)</i> – Metaloproteinase(s) de Matriz
MSP	<i>Major surface protein</i> – Proteína Maioritária de Superfície
MT-MMP	<i>Membrane-type matrix metalloproteinase(s)</i> – Metaloproteinase(s) de Matriz associada à Membrana
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> – solução tampão salina
PDB	<i>Protein Databank</i> – Banco de Dados de Proteínas
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i> - Fluoreto de Fenilmetilsulfonyl
SDS	<i>Sodium Dodecylsulphate</i> – Dodecilsulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
<i>T. b. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>

<i>T. b. gambiense</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF- β	<i>Tumour growth factor</i> β – Factor de Crescimento Tumoral β
THA	Tripanosomose Humana Africana
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases</i> – Inibidores Tecidulares de Metaloproteinases de Matriz
TNF- α	<i>Tumour Necrosis Factor</i> α – Factor de Necrose tumoral α
TSA	Trans-sialidase
VSG	<i>Variant Surface Glycoprotein</i> – Glicoproteína Variante de Superfície

1. Introdução

1.1. Generalidades

As metaloproteinases de matriz (MMP), ou matrixinas (EC 3.4.24), são uma sub-família de metaloproteinases que consiste em vinte e cinco diferentes proteases (Klein *et al.*, 2011), vinte e três das quais codificadas no genoma humano (Kessenbrock *et al.*, 2010). A primeira identificação de uma MMP foi feita em 1962, quando Gross e Lapiere descreveram uma proteinase animal neutra capaz de degradar a tripla hélice do colagénio em condições fisiológicas de pH e temperatura, durante a metamorfose de girinos. Esta protease foi renomeada mais tarde como MMP-1, quando estudos subsequentes começaram a identificar e caracterizar outras metaloproteinases responsáveis pelo *turnover* da matriz extracelular através da degradação proteolítica de virtualmente todos os componentes proteicos da matriz extracelular (Woessner *et al.*, 1991), *in vitro* bem como *in vivo* (Bode *et al.*, 1999). As MMP são ubíquas no organismo humano, encontrando-se por exemplo na pele, nas gengivas, nos ossos, cartilagens, tendões e ligamentos, e na córnea ocular (Golub *et al.*, 2011). A excessiva destruição destes constituintes é um evento chave na patogénese de inúmeras doenças, desde as inflamatórias (artrite reumatoide, aterosclerose, periodontite), às metabólicas (osteoporose pós-menopausa, osteopénia induzida pela diabetes), até às cancerígenas (metastização tumoral, tumorigénese) (Sorsa *et al.*, 2006; Golub *et al.*, 2011).

1.2. Metaloproteínas e Metaloproteinases de Matriz

As metaloproteínas correspondem a cerca de 25 % de todas as proteínas conhecidas (Maret *et al.*, 2009). De facto, o seu cofactor metálico confere-lhes um imenso potencial catalítico, não apenas devido às reacções de transferência de electrões inerentes aos iões metálicos, mas também pelo seu impacto na estabilidade da proteína (Cvetkovick *et al.*, 2010). Por consequência, as metaloproteínas possuem papéis relevantes na maioria dos processos biológicos, como por exemplo na respiração (ferro e cobre), na fotossíntese (manganês) e no metabolismo de fármacos (ferro).

O potencial catalítico das metaloproteínas tem sido amplamente comprovado com o estudo das metaloproteinases, uma família de endopeptidases dependentes de zinco e

cálcio. De entre estas, as MMP assumem particular relevo devido à sua importante participação em diversos processos, tanto fisiológicos como patogénicos.

1.2.1. Bioquímica das Metaloproteinases

1.2.1.1. Bioquímica Estrutural

A estrutura geral das MMP apresenta três características modulares que são comuns a quase todas as metaloproteinases: o pró-peptído n-terminal (com cerca de 80 resíduos), o domínio catalítico (cerca de 170 resíduos) e o domínio c-terminal semelhante a hemopexina (cerca de 195 resíduos), que se liga ao domínio catalítico através de uma região de Hinge flexível (que contém 10 a 70 resíduos), rica em prolínas (figura 1) (Bode *et al.*, 1999; Kessenbrok *et al.*, 2010; Geurts *et al.*, 2012). Além disso, durante a sua síntese, as MMP são acrescentadas de um péptido n-terminal com cerca de vinte aminoácidos (Bode *et al.*, 1999), cuja função ainda não foi apontada. Interessantemente, além do zinco catalítico

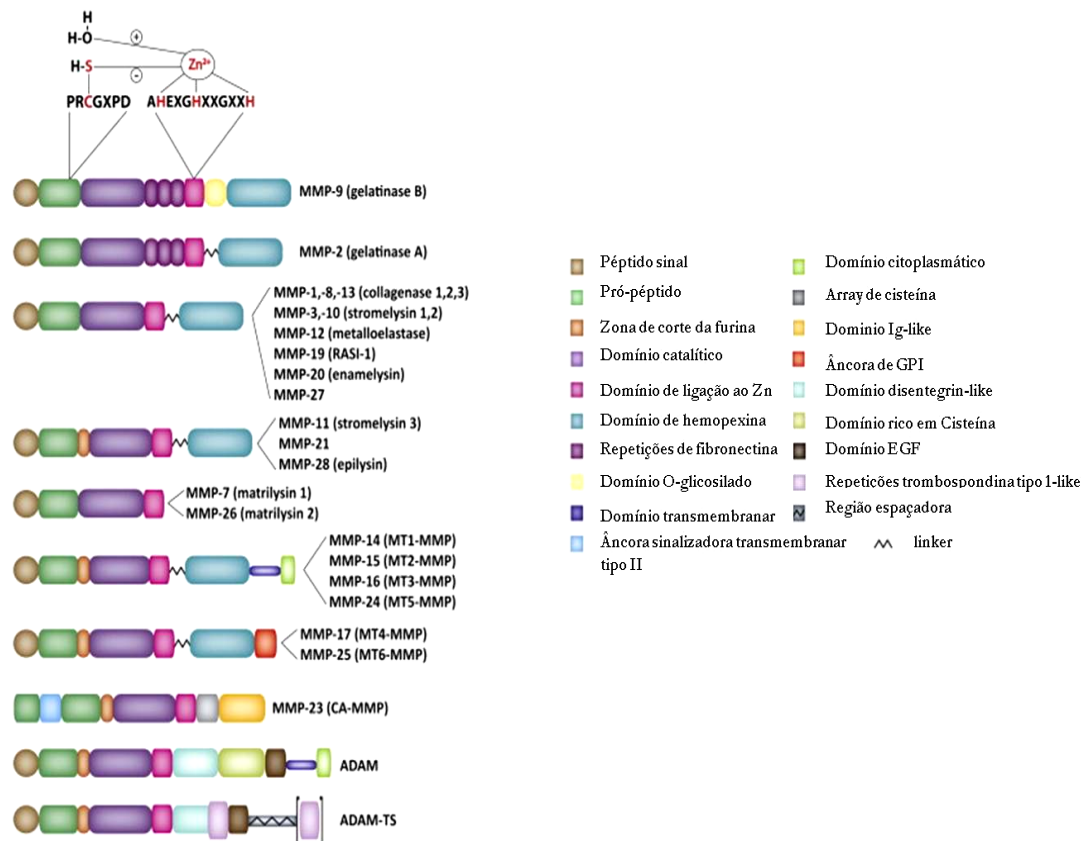


Figura 1. Composição das MMP. As metaloproteinases de matriz são constituídas por diferentes subdomínios. Todas têm um “domínio mínimo” em comum, que contém as três principais regiões da proteína: uma sequência sinal amino-terminal (a castanho) que é clivada por peptidases durante a entrada para o retículo endoplasmático, um pró-domínio (a verde escuro) que contém um grupo tiol e uma zona de clivagem pela furina, e o domínio catalítico (a lilás) com uma zona de ligação ao zinco (adaptado de Geurts *et al.*, 2012).

obrigatório, as MMP são únicas entre as restantes metaloproteases visto que incorporam um segundo átomo de zinco, com um papel estrutural, como componente integral da conformação básica (Borkakoti *et al.*, 1998). Além disso, a sua estrutura terciária é dominada por uma estrutura de folha β no domínio catalítico do enzima.

Ensaio de determinação cristalográfica demonstraram que o pró-domínio das MMP (figura 2) consiste numa unidade configurada de forma independente, caracterizada por três hélices alfa separadas por regiões flexíveis de estrutura secundária indefinida (Becker *et al.*, 1995). Esta zona c-terminal contém uma sequência consenso ligada ao sítio activo da região catalítica numa conformação estendida, resultante da interacção entre um resíduo de cisteína do pró-domínio com um ião de zinco no sítio activo (Borkakoti *et al.*,

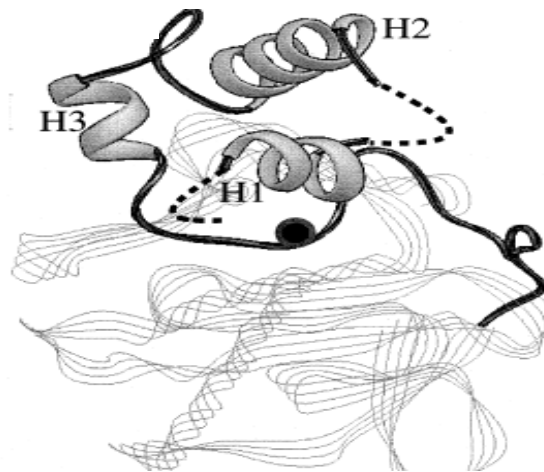


Figura 2. Pró-domínio das MMP. Diagrama em fita mostrando a estrutura observável do pró-domínio da MMP-3. H1, H2 e H3 indicam as três hélices alfa. As linhas quebradas denotam regiões sem densidade electrónica visível. A localização do domínio catalítico é mostrada em linhas mais finas. A posição do zinco catalítico está marcada com uma esfera escura (adaptado de Borkakoti *et al.*, 1998).

1998); isto significa que as MMP são expressas numa forma enzimaticamente inactiva (zimogénio), e que só após a disrupção desta interacção através de um mecanismo chamado *cysteine switch*, habitualmente mediado pela remoção proteolítica do pró-domínio ou de uma modificação química do resíduo de cisteína supracitado, é possível à enzima tornar-se activa. Esta clivagem é mediada por convertases e pode ocorrer intra- ou extracelularmente (Sternlicht e Werb, 2001).

Em relação às três hélices alfa da região n-terminal da proteína, a compilação de dados de análise bioinformática comparativa das sequências de MMP, indica que as sequências codificantes para esta região são altamente conservadas, o que por sua vez

sugere uma conformação espacial semelhante para os pró-domínios de todas as matrixinas (Borkakoti *et al.*, 1998). Além disso, essa análise sugere que a configuração destes domínios poderá ter sido um evento evolucionário precoce, que terá sofrido posteriormente fenómenos de diversificação (Bode *et al.*, 1999).

O domínio catalítico das MMP merece particular atenção. O sítio catalítico do enzima (com geometria trigonal-bipiramidal, penta-coordenada) (Borkakoti *et al.*, 1998) insere-se numa fissura ao longo da superfície do domínio catalítico, que tem a forma de um elipsoide oblongo. Essa fissura estende-se horizontalmente ao longo do domínio catalítico e é capaz de ligar substratos peptídicos (figura 3) e coordenar zinco como cofactor, servindo também como fronteira entre os dois subdomínios do domínio catalítico: o subdomínio inferior, de tamanho menor, e o superior. O subdomínio superior (formado

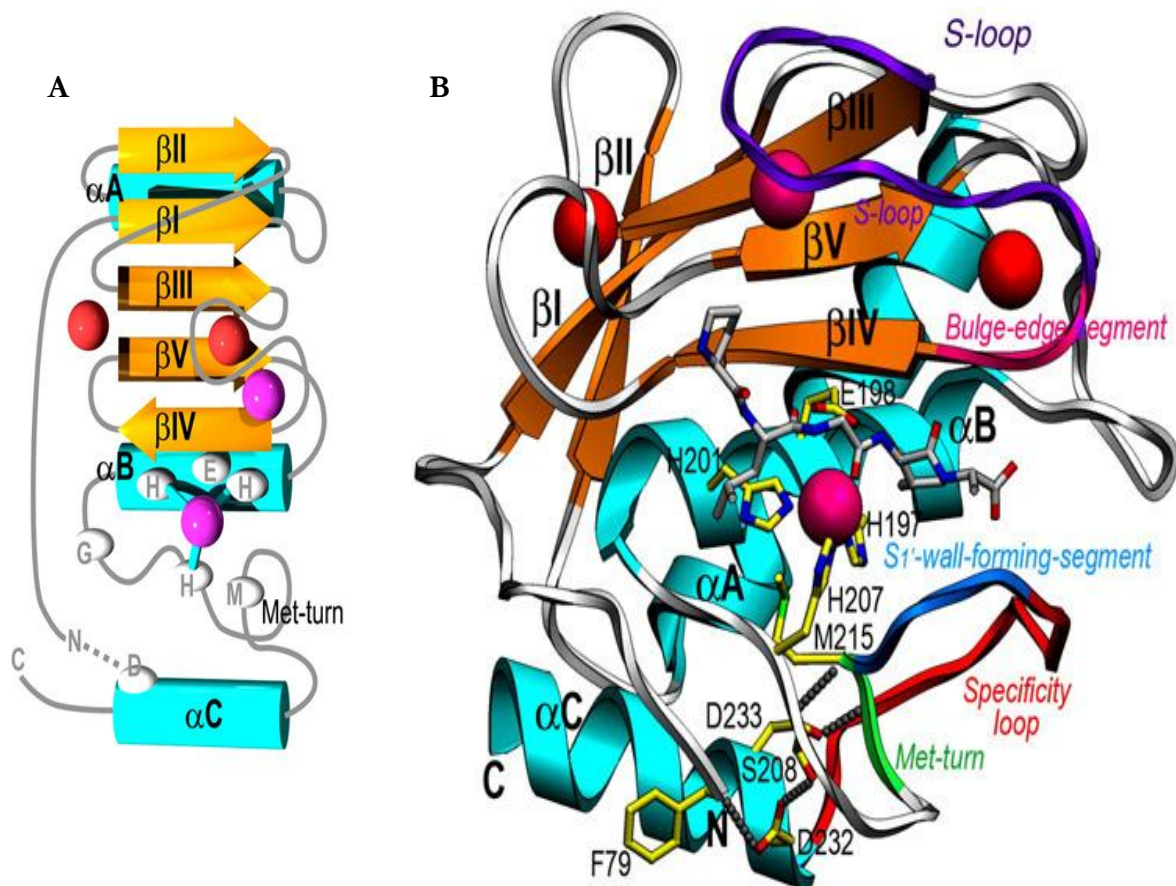


Figura 3 – Estrutura do domínio catalítico das MMP. Esquemas do domínio catalítico das MMP, em topologia (A) e estereografia (B). Os elementos secundários repetitivos (setas cor de laranja para folhas β , β I a β V, fitas azuis para hélices α , α A a α C) e os quatro catiões (dois íões de zinco em magenta e dois íões de cálcio em vermelho) são mostrados. As cadeias laterais das histidinas ligandos do zinco, o resíduo de glutamina, uma metionina que forma uma *Met-turn* e os resíduos envolvidos em interações electrostáticas chave (pontos cinzentos) são também indicados (adaptado de Tallant *et al.*, 2010).

por três quartos da cadeia polipeptídica) consiste numa folha β de cinco cadeias – quatro paralelas e uma antiparalela – flanqueada por três *loops* no lado convexo e duas hélices α longas e regulares no lado côncavo, abarcando um grande núcleo hidrofóbico (figura 3) (Borkakoti *et al.*, 1998; Bode *et al.*, 1999; Tallant *et al.*, 2010). A terceira e a quarta dobras da folha β anteriormente mencionada, ligadas entre si por um *loop* duplo que é estabilizado pelo cofactor e por outras ligações de cálcio, têm uma importância fundamental na ligação dos substratos peptídicos e de possíveis inibidores.

Além disso, esta zona tem importância no mecanismo de acção das MMP visto que o resíduo de glutamina adjacente à primeira histidina ligando do cofactor (His218) atrai os átomos de hidrogénio das moléculas de água presentes até ao zinco catalítico, permitindo assim o ataque nucleofílico às ligações peptídicas do substrato, que é então quebrado (Henderson e Davies, 1991). O ataque nucleofílico é polarizado pelo resíduo de glutamina em valores de pH próximos ao neutro, e para que tal aconteça, é necessário que se forme um complexo de Michaelis entre o substrato e a enzima (Tallant *et al.*, 2010), com os dois produtos resultantes da clivagem do substrato permanecendo inicialmente ligados à enzima sob a forma de um complexo (Tallant *et al.*, 2010). Mais, foi demonstrado que a libertação destes produtos é de facto o passo limitante da reacção (Solomon *et al.*, 2007).

De acordo com a sua estrutura e propriedades funcionais, a família das MMP pode ser dividida em 5 grupos: (i) as collagenases: MMP-1, 8 e 13; (ii) as gelatinases A e B: MMP-2 e 9; (iii) as estromelisinases 1 e 2: MMP-3 e 10; (iv) um subgrupo mais heterogéneo contendo matrilisina (MMP-7), enamilisina (MMP-20), o produto do gene *mmp* 20, a metaloelastase de macrófagos (MMP-12), e a MMP-19 (que juntas representam as metaloproteinases “clássicas”; e (v) as MMP de membrana (MT-MMPs-1 a 4 e a estromelisina-3, MMP-11) (Borkakoti *et al.*, 1998; Vaalamo, 2000). A tabela 1 resume a informação disponível na literatura.

1.2.1.2. Regulação da expressão das MMP

Devido ao seu papel essencial e à sua influência sobre diversos processos fisiológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogénese tecidual, entre outros (Sternlicht *et al.*, 2010), a actividade das MMP deve ser rigorosamente controlada. Apesar de vários níveis de regulação terem já sido descritos, existem ainda inúmeras camadas de complexidade para serem desvendadas; no entanto, parece certo que

Tabela 1 – Metaloproteinases de matriz, os seus substratos, activadores exógenos, e capacidade activadora.

<i>Enzima</i>	<i>Substratos</i>	<i>Activado por</i>	<i>Activador de</i>
Colagenases			
Colagenase 1 (MMP-1)	Colagénio I, II, III (III>I), VII, VIII, X, gelatina, agrecan, versican, L-selectina, entactina, serpinas, α -2 macroglobulina, precursor do TNF, MBP	MMP-3, -10, plasmina, calicreína, quimase	MMP-2
Colagenase 2 (MMP-8)	Colagénio I, II, III (I>III), VII, VIII, X, gelatina, agrecan, fibronectina, laminina, serpinas, VII, VIII, X, α -2 macroglobulinas	MMP-3, -10, plasmina	ND
Colagenase 3 (MMP-13)	Colagénio I, II, III (II>I ou III), IV, IX, X, XIV, gelatina, agrecan, perlecan, fibronectina, laminina, fibrilina, serpinas, tenascina	MMP-2, -3, -10, -14, -15, plasmina	MMP-2, -9
Gelatinases			
Gelatinase A (MMP-2)	Gelatina, colagénio I, IV, V, VII, IX, X, XIV, agrecan, versican, fibronectina, laminina, tenascina, fibrilina, elastina, vitronectina, α -2 macroglobulina, precursor do TNF, MBP	MMP-1, -7, -13, -14, -15, -16, -24	MMP-9, -13
Gelatinase B (MMP-9)	Gelatina, colagénio IV, V, VII, X, XIV, agrecan, versican, nidogénio, fibronectina, fibrilina, entactina, elastina, vitronectina, angiostatina, α -2 macroglobulina, α 1-antitripsina, precursor do TNF, MBP	MMP-2, -3, -13, plasmina	ND
Estromelisinases			
Estromelisinase 1 (MMP-3)	Colagénio III, IV, V, IX, X, gelatina, versican, nidogénio, agrecan, perlecan, fibronectina, laminina, tenascina, fibrilina, entactina, elastina, precursor do TNF, MBP	Plasmina, calicreína, quimase, triptase, elastase, catepsina G	MMP-1, -8, -9, -13
Estromelisinase 2 (MMP-10)	Colagénio III, IV, V, gelatina, nidogénio, agrecan, fibronectina, elastina	Idem a estromelisinase 1	MMP-1, -7, -8, -9, -13
Estromelisinase 3 (MMP-11)	Inibidor α -1 de proteinase, fraca actividade em agrecan, fibronectina, laminina	Furina	ND
Matrilisina (MMP-7)	Colagénio IV, gelatina, versican, nidogénio, agrecan, fibronectina, laminina, tenascina, vitronectina, MBP, angiostatina	MMP-3, plasmina	MMP-2
Metaloelastase (MMP-12)	Colagénio IV, gelatina, nidogénio, agrecan, fibronectina, laminina, fibrilina, elastina, vitronectina, α -1 antitripsina, precursor do TNF, angiostatina	ND	ND
MMP de membrana			
MT1-MMP (MMP-14)	Colagénio I, II, III, gelatina, nidogénio, agrecan, perlecan, fibronectina, laminina, tenascina, vitronectina, fibrilina	Plasmina, furina	MMP-2, -13
MT2-MMP (MMP-15)	Agrecan, perlecan, fibronectina, laminina, nidogénio, tenascina	ND	MMP-2, -13
MT3-MMP (MMP16)	Gelatina, caseína	ND	MMP-2
MT4-MMP (MMP-17)	Gelatina, precursor do TNF	ND	MMP-2
MT5-MMP (MMP-24)	ND	ND	MMP-2
Outras MMP			
MMP-18 e -19	Gelatina	Tripsina	ND
Enamelisina (MMP-20)	Amelogenina	ND	ND
MMP-21, -22 e -23	ND	ND	ND

Adaptado de Vaalamo, 2000. MBP: *Myelin basic protein*, proteína mielínica alcalina. TNF: *Tumour necrosis factor*, factor de necrose tumoral. ND: não definido.

a multiplicidade de MMP (com perfis distintos mas até certo ponto com funções sobreponíveis) serve provavelmente como uma salvaguarda contra qualquer perda de controlo regulatório. Apesar desta redundância e destes mecanismos de compensação serem vantajosos para o organismo, também são capazes de gerar discussão e dúvida no esforço para compreender o comportamento *in vivo* das MMP.

Embora várias questões permaneçam em aberto, parece seguro pensar que as MMP são portanto rigorosamente controladas por diferentes mecanismos, durante virtualmente todos os aspectos da sua longevidade biológica, desde a indução até à sua destruição final. A figura 4 resume de forma simples os pontos críticos de controlo biológico sobre as MMP.

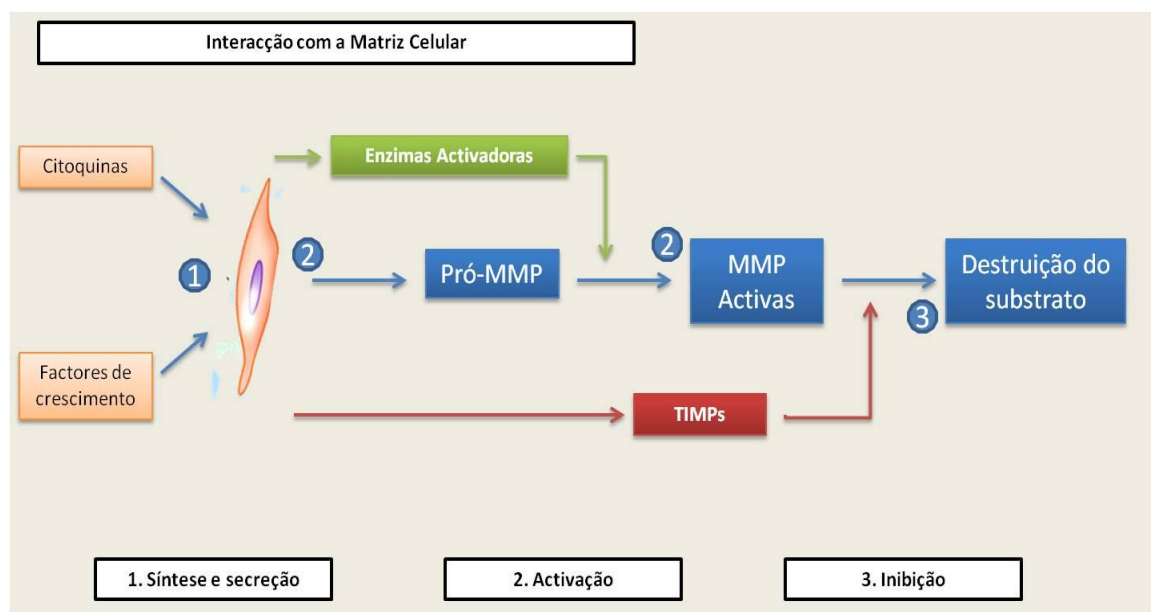


Figura 4 – Controlo biológico das MMP. De forma resumida, as MMP podem ser controladas em 3 pontos críticos: (1) na estimulação da sua síntese e secreção; (2) na activação das pró-enzimas; e (3) na inibição das MMP activas (adaptado de Cawston, 1996). Nota: TIMP é o acrónimo para inibidores endógenos das MMP.

1.2.1.2.1 Regulação transcriptional e pós-transcriptional

A nível da transcrição, a expressão das MMP pode ser controlada por diversos factores de crescimento, promotores tumorigénicos, oncogenes e hormonas (Woessner *et al.*, 1991; Matrisian, 1992). Os genes das MMP apresentam uma estrutura modular altamente conservada (Chakraborti *et al.*, 2003): as sequências codificantes para collagenases e estromelisinases contêm dez exões e nove intrões, em 8 a 12 Kpb, os genes que codificam para as gelatinases são consideravelmente maiores (26 a 27 Kpb) e contêm três exões

adicionais, que codificam para os três domínios de fibronectina tipo II (Chakraborti *et al.*, 2003) adicionais.

Estudos (revistos por Woessner *et al.*, 1991) na zona 5' *upstream* dos genes que codificam para as MMP mostraram que a sua regulação transcriptional é em parte assegurada por um mecanismo do tipo *leucine zipper*, com duas proteínas associando-se num heterodímero que bloqueia a transcrição. Mais ainda, foi mostrado que a expressão dos genes que codificam para MMP é altamente modulada por produtos dos genes das famílias oncogénicas *Fos* e *Jun* (Mauviel *et al.*, 1993).

Da mesma forma, é sabido que as matrixinas não são armazenadas na maior parte das células (à excepção dos macrófagos e neutrófilos) (Woessner *et al.*, 1991); a maioria sintetiza e secreta de imediato as MMP para a matriz extracelular, embora algumas sejam secretadas constitutivamente (como a gelatinase A, ou MMP-2) e outras sejam sintetizadas principalmente após estimulação (como a collagenase) (Chakraborti *et al.*, 2003). Neste caso, quando a estimulação cessa ou são recebidos sinais negativos, a síntese das MMP pára ou decai para níveis basais (Woessner *et al.*, 1991). Estes sinais ou agentes regulatórios funcionam quase exclusivamente a nível da transcrição, como discutido anteriormente.

Outros factores, como aqueles que afectam a conformação celular e influenciam o citoesqueleto de actina, são particularmente eficazes na indução da expressão dos genes que codificam para MMP (Frisch e Werb, 1989). Muitos destes factores estão implicados em processos patológicos que acompanham a desintegração de matrizes. Já a nível pós-transcriptional, a actividade das MMP é regulada maioritariamente por activação proteolítica de proenzimas latentes, ou através da interacção com inibidores específicos.

1.2.1.2.2 Inibidores endógenos

Habitualmente, o potencial degenerativo das MMP é controlado pelos inibidores endógenos das MMP, ou TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). A disrupção do balanço MMP/TIMPs pode resultar em desordens como a artrite reumatoide, osteoartrite, aterosclerose, formação e crescimento de tumores, fibrose, entre outras (Bode *et al.*, 1999).

Os TIMPs são proteínas eucarióticas antigas com uma história evolutiva complexa (Brew *et al.*, 2000), representando uma família de quatro proteínas secretadas, (TIMPs 1 a 4), com massas compreendidas entre os 20 e os 29 kDa, capazes de se ligar de forma selectiva, não-covalente e reversível, às MMP, numa proporção binária estequiométrica 1:1

(Chang *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2011) (figura 5). Cada um dos TIMPs difere na capacidade em inibir diferentes MMP, e, além disso, são também regulados diferencialmente a nível genético e tecidual (Sternlicht *et al.*, 2001), encontrando-se presentes quase de forma ubíqua na maioria dos tecidos e fluidos corporais (Lambert *et al.*, 2004).

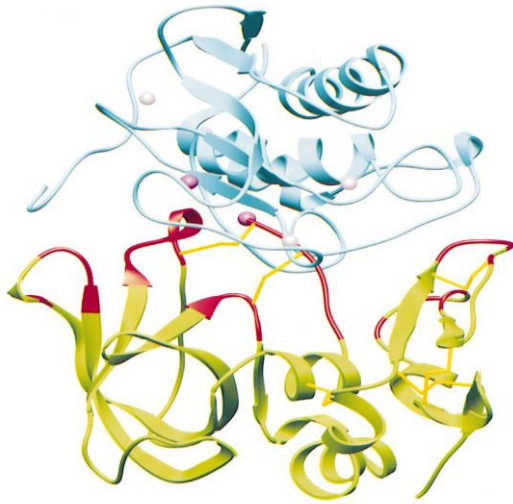


Figura 5 – Representação cristalográfica do complexo MMP-TIMP. O complexo formado pela enzima (em cima, fita azul) e o inibidor (em baixo, fita verde), mostrando também as zonas do inibidor que distam menos de 5 Å da enzima (zonas a vermelho). Os íões de zinco e de cálcio são indicados respectivamente pelas esferas lilás e cinza. O inibidor liga-se ao sítio activo do enzima, mimetizando o seu substrato natural (adaptado de Brew *et al.*, 2000).

Os TIMPs inibem a actividade de MMP activadas e também parecem ser capazes de bloquear ou retardar a activação dos precursores das MMP (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). O papel destes inibidores endógenos na regulação da degradação matricial pode portanto ser exercido não apenas pela eliminação proteolítica clássica mas também de forma mais eficaz, como o bloqueio interceptivo da activação das MMP (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). No entanto, é necessário tomar em consideração que os TIMPs foram descritos como moléculas que agem de forma promíscua em relação ao seu papel como inibidores das MMP (Castro *et al.*, 2011a). De facto, o elevado nível de divergência nas sequências filogenéticas dos quatro TIMPs sugere que estes inibidores são provavelmente diferentes em relação às suas propriedades funcionais (Brew *et al.*, 2000), e mais, foi demonstrado que os TIMPs possuem também diversos papéis biológicos diversos daquele que lhes é habitualmente atribuído, incluindo actividades embriogénicas, esteroideogénicas, anti-apoptóticas e anti-angiogénicas (Brew *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2004).

Em termos estruturais, os TIMPs contém, na sua sequência de 184-195 aminoácidos, 12 resíduos de cisteína conservados que dividem a proteína em dois domínios distintos que adquire uma estrutura com seis *loops* (Castro *et al.* 2011a). Esta estrutura confere estabilidade contra variações de temperatura e pH (Williamson *et al.*, 1990), no

entanto o curto tempo de meia-vida *in vivo* inviabiliza a sua utilização em aplicações farmacológicas (Castro *et al.*, 2011a).

No entanto, os TIMPs não são os únicos inibidores endógenos das MMP. De facto, as macroglobulinas são também importantes na mesma função (Sottrup-Jensen e Birkedal-Hansen, 1989), apesar de a sua relevância ter sido negligenciada face aos restantes TIMPs. Posteriormente este tema será abordado com mais profundidade neste trabalho, sob o tópico 1.4.2.1.

1.2.1.2.3 Regulação catabólica e *clearance*

A forma mais evidente de regulação das MMP é através da sua própria inactivação proteolítica seguida de mecanismos de *clearance*. Apesar de o conhecimento sobre a autoproteólise das MMP ser limitado, alguns estudos mostraram que a clivagem de MMP activas pode, por um lado, inactivá-las totalmente ou, por outro, originar enzimas truncadas que perdem a capacidade de degradar alguns substratos, mas retêm a capacidade de degradar outros (Woessner e Nagase, 2000). Tal processamento (especialmente se envolver a remoção do domínio semelhante a hemopexina) também conduz à incapacidade do enzima em ligar-se à superfície celular (Sternlich *et al.*, 2001). Além disso, a secreção de MMP de membrana (MT-MMP, *membrane-type matrix metalloproteinases*), que ocorre quando as MMP sofrem clivagem ao atingir a membrana celular (Imai *et al.*, 1996), é um factor que pode influenciar as concentrações de MMP, a sua especificidade para um dado substrato, a sua localização, e a sua capacidade de estar activo ou inibido (Sternlich *et al.*, 2001).

Outra forma de regulação da concentração extracelular de MMP é a *clearance* directa de enzimas intactas. A maioria das MMP é capaz de clivar macroglobulinas, levando à alteração conformacional irreversível da última, que por sua vez captura a MMP criando um impedimento físico no contacto entre o enzima e outro substrato (Sottrup-Jensen e Birkedal-Hansen, 1989). Este complexo MMP/macroglobulina sofre eventualmente endocitose e sai definitivamente de circulação. Algo de semelhante ocorre com MMP ligadas a moléculas de trombospondina 2 (Yang *et al.*, 2001), ou a receptores específicos existentes em diferentes tipos de células (Barmina *et al.*, 1999).

1.2.1.2.4 Compartimentalização

É importante lembrar que as células não secretam proteínas de forma indiscriminada. As proteinases, como as MMP, são secretadas e ancoradas à superfície da membrana plasmática das células, focalizando assim a sua actividade catalítica em substratos específicos dentro do espaço pericelular (Chakraborti *et al.*, 2003). As interações específicas entre as células e as MMP, nomeadamente através de receptores, produzem um sinal inambíguo que adverte a célula sobre o ligando encontrado, e portanto sobre a proteinase que deve ser secretada, bem como onde e quando essa secreção deve ocorrer (Chakraborti *et al.*, 2003). Um exemplo deste tipo de regulação espaço-temporal é o caso da colagenase 1 em feridas cutâneas humanas. A colagenase 1 é induzida nas células epidérmicas basais (queratinócitos) em resposta a traumas, quando a célula se desloca da membrana basal e contacta com colagénio do tipo 1 na derme subjacente (Saarialho-Kere *et al.*, 1993). Apenas os queratinócitos basais que contactam com o colagénio dermal do tipo 1 expressam a colagenase 1, e esta resposta induzível é controlada especificamente por uma integrina. Isto sugere que a expressão e actividade de cada MMP específica podem ser confinadas a uma localização específica em um tecido activado.

1.2.2. Patofisiologia geral das Metaloproteinases

Inicialmente, julgava-se que a maquinaria proteolítica celular se encontrava dedicada fundamentalmente ao reconhecimento e eliminação de proteínas que estivessem decompostas ou incorrectamente conformadas. Porém, os progressos alcançados nesta área demonstraram papéis adicionais para a proteólise controlada numa grande variedade de importantes processos biológicos. Em particular, a crescente importância da modulação do microambiente extracelular através das MMP tornou-se evidente (Chang *et al.*, 2011), visto que as metaloproteases são reguladores extrínsecos de cada um destes processos – não apenas durante transformações malignas, mas também durante os processos fisiológicos normais (Chang *et al.*, 2011).

As vias proteolíticas podem ser, de forma geral, divididas em dois tipos: as vias intracelulares, com proteinases de cisteína e/ou aspartato clivando proteínas num ambiente ácido; e as vias extracelulares, onde a clivagem em meio neutro é conseguida com metaloproteinases e/ou proteinases de serina (Cawston *et al.*, 1996). As duas vias têm um papel nos fenómenos de *turnover* da matriz tecidular, variando em predominância de acordo

com a situação e podendo uma das vias, em alguns casos, preceder à outra (Cawston *et al.*, 1996).

Pelo seu papel na degradação das proteínas da matriz extracelular (ECM), atribui-se às MMP um papel primário na remodelação desta; no entanto, as MMP também têm acção sobre substratos diferentes dos matriciais, incluindo reguladores de crescimento (Chang *et al.*, 2011) (figura 6). A regulação coordenada das MMP e dos seus inibidores governa, portanto, a clivagem e libertação de importantes factores de crescimento e receptores à superfície da célula (Chang *et al.*, 2001) e mesmo no seu interior (Gorman *et al.*, 2011). Por exemplo, a actividade do factor de crescimento e transformação (TGF) é importante tanto para a diferenciação osteoblástica das células progenitoras em osteocistos terminalmente diferenciados, como para a resorção de osso osteoclástico; neste contexto, foi demonstrado *in vitro* que MMP-9 e MMP-2 são capazes de clivar proteoliticamente as formas latentes do TGF (Chang *et al.*, 2001). Mais, as MMP foram associadas à libertação de proteínas biologicamente activas, como citocinas e quimiocinas, das suas pró-formas ancoradas à membrana. Sendo assim, as MMP contribuem para a geração de proteínas com actividades drasticamente diferentes a partir do produto de um único gene original (Klein e Bischoff, 2011). Ressalve-se que as MMP não são as únicas proteases com actividade proteolítica à superfície das células; muitos outros enzimas como por exemplo a

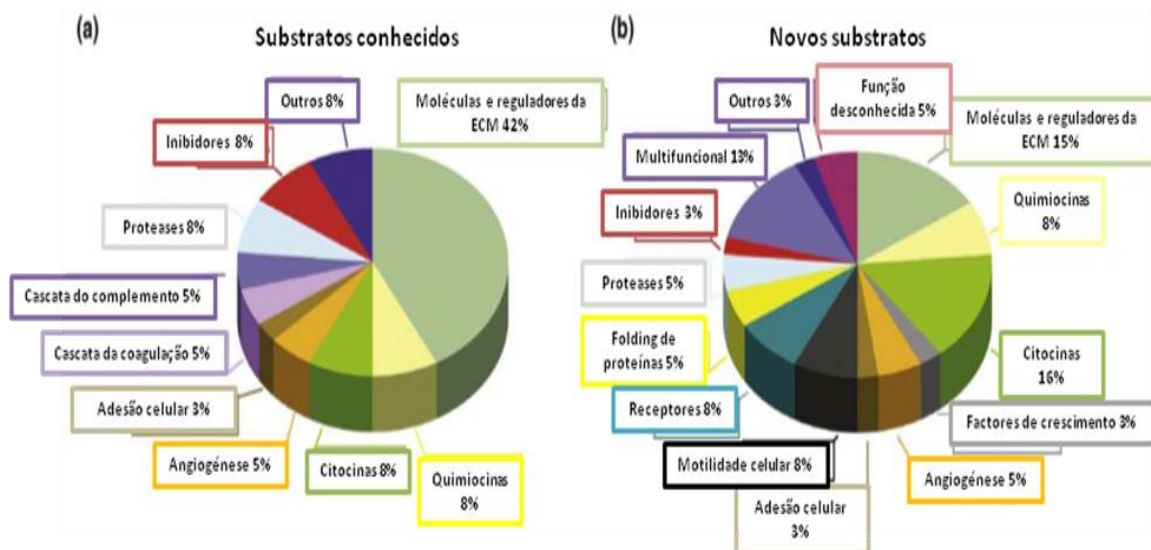


Figura 6 – Identificação dos diferentes substratos das MMP. Uma grande variedade de substratos das MMP foram identificados por análise proteómica de amostras biológicas complexas. Alguns dos substratos (a) foram previamente identificados, com predominância de moléculas e de reguladores da ECM, o que foi validado pelas técnicas proteómicas utilizadas. Muitos outros substratos (b) foram também identificados por proteómica e validados consequentemente por técnicas bioquímicas. Estes novos substratos exibem uma grande diversidade de funções (adaptado de Morrison *et al.*, 2009).

heparanase, expressa pelas plaquetas e pelas células tumorais ou inflamatórias, são capazes da mesma actividade (Chang *et al.*, 2011).

Em termos de patofisiologia (figura 7), as MMP são jogadoras cruciais no balanço entre as actividades proteolítica e anti-proteolítica que também as confina em termos de tempo e espaço. Quando este balanço é perturbado, diversos fenótipos de doença são observados, desde destruição tecidular em doenças inflamatórias crónicas (como a artrite ou a doença pulmonar obstrutiva), a metastização cancerígena e desordens neurológicas (Klein e Bischoff, 2011). Ainda assim, estudos recentes (Butler e Overall, 2009) sugerem que aproximações mais abrangentes sobre as funções das MMP poderão indicar um número ainda maior de papéis relevantes para estas proteinases, não se limitando estas aos papéis actualmente descritos. Com esta elevada diversidade de actividades, não parece surpreendente que as MMP estejam implicadas como reguladores pivotais de muitos

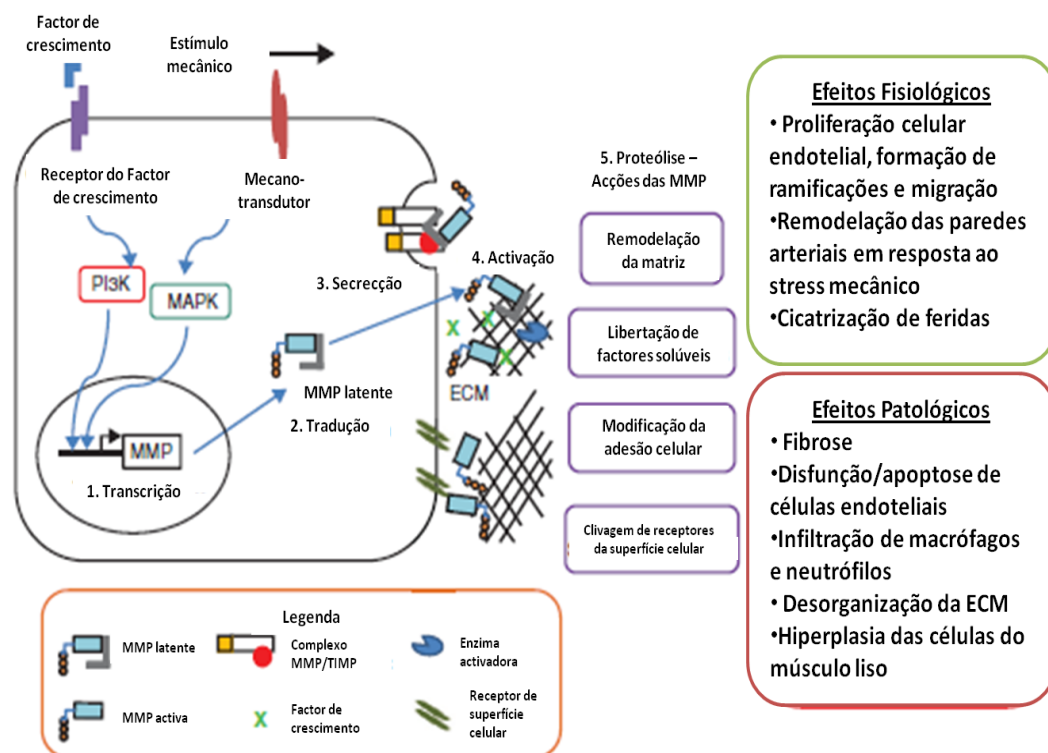


Figura 7: Consequências patofisiológicas da produção e activação das MMP. Este esquema ilustra a regulação da produção de MMP bem como o processo de activação pericelular. A activação de MMP leva à proteólise dos componentes da matriz extracelular, libertação de factores matriciais, modificação da adesão das células à matriz, e a alterações no perfil dos receptores à superfície das células. Estas acções contribuem para a manutenção fisiológica e para a remodelação dos compartimentos vasculares. No entanto, a proteólise excessiva conduz a consequências patológicas, e à progressão de diferentes doenças. Nota: PI3K – *phosphoinositide 3-kinase*, MAPK – *mitogen activated protein kinases*, MMP – *matrix metalloproteinase*, e ECM – *extracellular matrix*, matriz extracelular (adaptado de Gorman *et al.*, 2011).

processos fisiológicos e patológicos incluindo embriogénese, angiogénese, hipertensão, reparação muscular, cicatrização tecidual, isquemia e/ou reperfusão, aterosclerose e crescimento tumoral (Kleiner e Stetler-Stevenson, 1999; Gorman *et al.*, 2011). A figura 7 resume as consequências patofisiológicas da activação das MMP.

Portanto, de forma resumida, pode dizer-se que as MMP fazem parte de uma classe mais abrangente de metaloproteases, cumprindo os seus papéis – sempre complexos – tanto à superfície das células como na matrix extracelular, onde são importantes para a sobrevivência e para a morte celular.

1.3. Relevância das metaloproteinases em doenças causadas por tripanosomatídeos

De forma geral, o papel das proteases (nomeadamente metaloproteases) é reconhecido em processos fisiológicos básicos e na patogénese de muitos parasitas (Barbosa *et al.*, 2006). Mais, diferentes estudos demonstraram que diversos parasitas recorrem a múltiplas proteinases em várias tarefas inerentes a um estilo de vida parasítico. Neste contexto, as MMP contribuem para a capacidade de degradação de proteínas e péptidos, para a provisão de aminoácidos, para facilitar a infecção e disseminação através dos tecidos do hospedeiro, e para a evasão ao sistema imune (Klemba e Goldberg, 2002), entre outras funções essenciais.

1.3.1 Tripanosomose Africana

A Tripanosomose Humana Africana (THA), comumente conhecida como Doença do Sono, é uma doença tropical, negligenciada, que é actualmente um problema de saúde pública tanto quanto o era quando os estudos sobre esta patologia se iniciaram, há mais de 100 anos (Gillespie *et al.*, 2001). É causada pelo *Trypanosoma brucei rhodesiense* na África oriental e pelo *Trypanosoma brucei gambiense* na África ocidental. Segundo dados da OMS (2012), cerca de 95 % de todas as infecções humanas por *Trypanosoma* reportadas são provocadas por esta última espécie. Estas duas espécies protozoárias, unicelulares flageladas e extracelulares com cerca de 25-40 µm de comprimento, são morfologicamente indistinguíveis (figuras 8A e 8B, página seguinte), mas apresentam características epidemiológicas distintas. Enquanto a forma oriental da THA é caracterizada por um desenvolvimento rápido e agudo da doença, com a morte do paciente não-tratado a ocorrer

entre semanas a alguns meses após a infecção, a forma ocidental da THA é crónica e pode prolongar-se durante vários anos (Baral *et al.*, 2010). No entanto, ambas as formas da doença são caracterizadas por duas fases: a fase hemolinfática, precoce, e a fase meningoencefáltica, mais tardia. Passa-se para este estado de comprometimento neurológico quando o parasita invade o sistema nervoso central (SNC) (Gillespie e Pearson, 2001). O próprio termo “doença do sono” resulta da etiologia da doença, primariamente devido ao facto de a infecção do SNC provocar perturbações no ritmo circadiano (Vicendeau e Bouteille, 2006). Isto resulta numa sintomatologia de extrema fadiga que se delonga por vários anos antes que a fase final da doença se instale: toxemia, coma e morte.

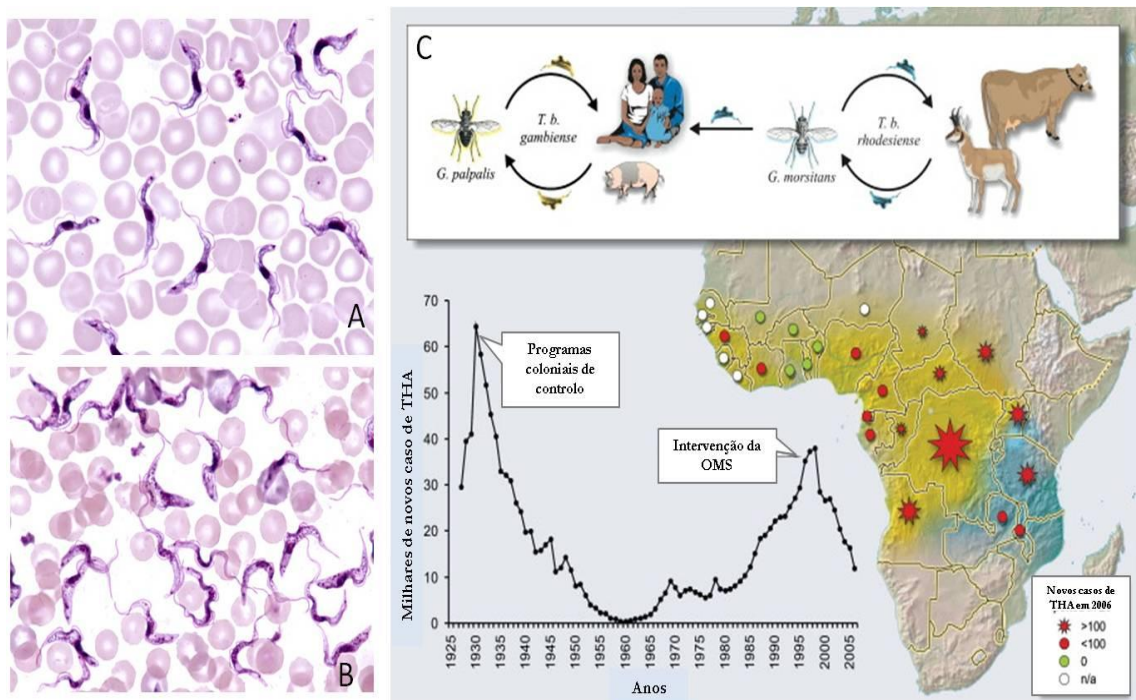


Figura 8 – Aspectos morfológicos, ciclo de transmissão, e incidência de infecções por *Trypanosoma brucei*. Imagem A: *Trypanosoma brucei gambiense* em esfregaço sanguíneo. Imagem B: *Trypanosoma brucei rhodesiense* em esfregaço sanguíneo. © Imagens A e B: Louisiana State University, disponíveis em studyblue.com. Imagem C: Ciclo simplificado de transmissão do *Trypanosoma brucei*, e incidência de infecções ao longo do tempo. Imagem C adaptada de Kristensson *et al.*, 2010.

É o mesmo vector, as moscas hematófagas de trinta e uma espécies diferentes dentro do género *Glossina* (Despommier *et al.*, 2005), o responsável pela transmissão cíclica do protozoário entre diferentes hospedeiros vertebrados (figura 8C). Este vector encontra-se amplamente distribuído por diversos habitats, numa área de 10 milhões de quilómetros quadrados de potencial terreno fértil em 37 países, que desta forma são inadequados para a criação de gado ou desenvolvimento de produção agrícola (Baral *et al.*,

2010). De facto, o impacto histórico da Tripanosomose é tão profundo que influenciou as rotas de migração de tribos que subsistem da criação de gado, que se viram forçadas a evitar as zonas com maior incidência das moscas *Glossina* – popularmente conhecidas como moscas *tsé-tsé* – bem como os movimentos de colonizadores Europeus e Árabes que dependiam de cavalos ou gado bovino em África (McKelvey, 1973). Actualmente, as estimativas mais recentes apontam para cerca de 60 milhões de pessoas em risco de contrair a doença. A maioria dos esforços empregues correntemente para reduzir a transmissão da doença foca-se no controlo do vector (Despommier *et al.*, 2005), bem como na expansão e sustentabilidade do diagnóstico precoce (OMS, 2012). O tratamento clínico de qualquer das fases da doença é limitado e pouco eficaz, apresentando pelo contrário sérios efeitos secundários, sendo extremamente tóxico e muitas vezes associado com a morte do paciente em tratamento (De Atouguia e Kennedy, 2000; Lutje *et al.*, 2010). Da mesma forma, não existem vacinas disponíveis, uma vez que os processos clássicos de imunização falham em produzir uma resposta imune adequada no caso desta doença (Silva *et al.*, 2009; Lança *et al.*, 2011).

A infecção no hospedeiro inicia-se quando a forma infectante do parasita, a forma metacíclica, é injectada intradermicamente pela mosca durante a sua refeição. O parasita rapidamente evolui para formas sanguíneas tripomastigotas (longas e esguias) e se divide por fissão binária nos espaços intersticiais no local da picada (Despommier *et al.*, 2005). Por sua vez, a mosca *tsé-tsé* fica infectada por ingestão de uma refeição sanguínea de um hospedeiro infectado. No intestino do insecto vector, os tripanossomas evoluem para a forma tripomastigota procíclica, e continuam a dividir-se e proliferar durante cerca de 10 dias (Despommier *et al.*, 2005). Quando estes ciclos de divisão celular estão completos, os parasitas migram para as glândulas salivares da mosca e evoluem para formas epimastigotas. Estas formas, por sua vez, dividem-se e evoluem para formas metacíclicas, que infectam novos hospedeiros reservatórios.

Neuropatologicamente, as alterações observadas durante a fase meningoencefálica da THA são caracterizadas pela infiltração de células inflamatórias no cérebro, de forma especialmente proeminente na matéria branca (leucoencefalite). Na fase terminal da doença, a atrofia e desmielinização do SNC é acompanhada por perturbações de consciência e demência incoerente, incontinência e surtos epilépticos. O paciente morre em estado de caquexia e miséria fisiológica (Vincendeau e Bouteille, 2006). Apesar da invasão do fluido cerebrospinal (CSF – do inglês *cerebral-spine fluid*) ocorrer relativamente cedo, o

parasita permanece indetectável neste fluido até bastante mais tarde na infecção, provavelmente porque o CSF proporciona um ambiente hostil ao seu desenvolvimento (Gillespie *et al.*, 2001; Vicendeau e Bouteille, 2006). O facto de o CSF ser ou não adequado à proliferação do *Trypanosoma brucei* é ainda discutível (Pentreath *et al.*, 1992; Mulenga *et al.*, 2001), mas parece certo que as reacções observadas nesse fluido podem ser determinantes no diagnóstico e particularmente nas decisões sobre o curso de tratamento para a doença, visto que os tripanossomas podem modificar o seu metabolismo de acordo com o meio circundante, e portanto alterar a sua sensibilidade a fármacos (Enanga *et al.*, 2002). De qualquer forma, a permeação para o CSF permite ao parasita aceder ao tecido cerebral profundo, gerando uma intensa reacção inflamatória que resulta em sequestro perivascular generalizado (Poltera *et al.*, 1980; Gillespie *et al.*, 2001). Os infiltrados celulares sugerem que a resposta imune contra a invasão do SNC por tripanossomas é mediada por células B dependentes de linfócitos T (figura 9, página seguinte) (Geurts *et al.*, 2012). Não obstante, o principal obstáculo físico a ser ultrapassado nesta invasão é a barreira hematoencefálica (BBB – do inglês *blood/brain barrier*), a barreira física e metabólica entre o SNC e a periferia. Esta barreira, altamente especializada, é uma estrutura dinâmica integrada composta por células cérebro-epiteliais apostas justamente de forma robusta e unidas por junções rígidas (*tight junctions*), sem os espaços intercelulares que habitualmente medeiam as restantes células endoteliais no organismo (Lonsdale-Eccles e Grab, 2002). A BBB é constituída por células endoteliais e astrócitos, e duas membranas basais: uma membrana endotelial e uma membrana parenquimatosa (Masocha *et al.*, 2007).

Pelo seu tamanho, parece improvável que o *Trypanosoma* seja capaz de agir fisicamente contra a BBB; assim, é mais provável que o parasita interaja com essa barreira de forma multifactorial. O mais popular dos mecanismos sugeridos propõe que o parasita entra no cérebro indirectamente através de áreas especializadas onde a barreira endotelial está incompleta (Poltera *et al.*, 1980). No entanto, parece inverosímil que o atravessamento transversal da BBB ocorra de forma intracelular, mas antes através de uma lesão transiente numa barreira danificada. É possível que a penetração do *T. brucei* na BBB envolva difusão de substâncias com origem no parasita (especialmente hidrolases, proteases, ácidos gordos saturados ou derivados de aminoácidos aromáticos) ou no próprio hospedeiro [endotoxinas, prostaglandinas, óxido nítrico, factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferão gama (IFN- γ)] que promovam a penetração do parasita (Tizard *et al.*, 1978; Lonsdale-Eccles e Grab, 2002).

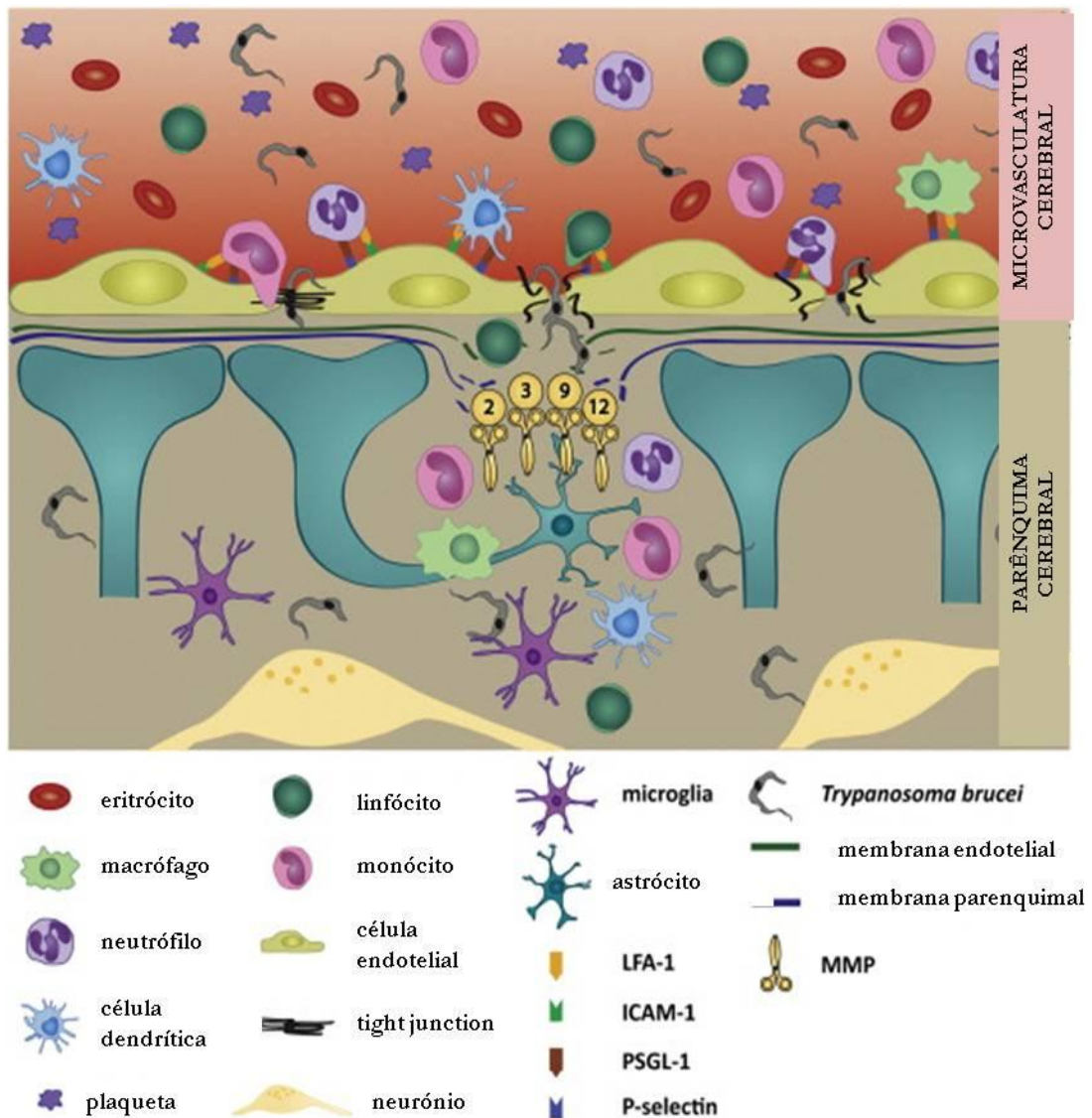


Figura 9 - Alterações na barreira hematoencefálica durante THA. A fase meningoencefálica da THA é induzida quando o *Trypanosoma brucei* atravessa a BBB, um evento que é acompanhado pelo influxo de leucócitos. Apesar de não existir consenso sobre a disrupção das *tight junctions*, a degradação da lâmina basal é obrigatória para que os parasitas e os leucócitos ganhem acesso ao parênquima cerebral. Foi demonstrado que diversas MMP, e.g. MMP-2, -3, -9 e -12 são sobre-reguladas no cérebro durante a infecção por THA (adaptado de Geurts *et al.*, 2012).

O processo inflamatório iniciado no sangue pode também incrementar a permeabilidade da BBB ao parasita, visto que esta pode ter um papel activo na adjudicação da resposta neuroimune, quer pela produção de mediadores inflamatórios ou pela expressão de moléculas de adesão (Mulenga *et al.*, 2001; Viswambharan *et al.*, 2003). De facto, apesar de a acumulação de IFN- γ poder ter um efeito directo sobre os parasitas

(Darji *et al.*, 1993), poderá também facilitar a migração do *T. brucei* através do parênquima cerebral, através possivelmente da indução da alteração das propriedades adesivas da laminina, ou, mais indirectamente, da indução de moléculas necessárias à desintegração da membrana basal, como as metaloproteinases (Sixt *et al.*, 2001; Masocha *et al.*, 2007). A corroborar esta hipótese existe o facto de inibidores de metaloproteinases reduzirem a disrupção da BBB (Yong *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 2009). Interessantemente, o *T. brucei* parece capaz de penetrar no SNC sem causar uma evidente disrupção das *tight junctions* referidas anteriormente (Dumas e Bouteille, 1997; Lonsdale-Eccles e Grab, 2002; Hamm *et al.*, 2004), que se mantêm preservadas e não demonstram sinais de extravasação de proteína plasmática para o parênquima cerebral após a penetração do parasita (Mulenga *et al.*, 2001; Nikolskaia *et al.*, 2006). Isto indica que a disseminação do tripanossoma para o interior do cérebro é um processo activo, e não uma difusão passiva secundária à desintegração da BBB.

Desta forma, foi postulado (De Sousa *et al.*, 2009; Masocha e Kristensson, 2012) que a actividade proteolítica – especialmente as actividades colagenolítica e gelatinolítica – dos produtos do *Trypanosoma* podem ter um papel relevante na migração através dos tecidos do hospedeiro devido à sua capacidade de degradação dos componentes de matriz, conduzindo à desintegração da organização da matriz extracelular. Esta hipótese é reforçada pelo facto da expressão de MMP poder ser não-constitutiva, mas antes induzida por sinais exógenos como citocinas, factores de crescimento, alteração na matriz celular ou nos contactos intercelulares (Johansson *et al.*, 2000; Cheng e Lovett, 2003; Acharya *et al.*, 2004). Mais ainda, foi também demonstrada, para pacientes da fase meningoencefalítica de THA, um elevado nível de MMP-2 e MMP-9 (gelatinases) no CSF, correlacionando-se estes também com o número de leucócitos no mesmo fluido (Rosenberg *et al.*, 2009) e com a severidade da doença (Hainard *et al.*, 2011), pelo que a modulação destas matrixinas poderá ter um papel importante na neuropatologia da doença.

1.3.1.2 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que constituem um problema de saúde pública com intensidade crescente. Representam um complexo de doenças com diversidade clínica e epidemiológica (Yurdakul, 2005), sendo causadas por um protozoário do género *Leishmania* (figura 3A), família *Trypanosomatidae*, e transmitida pela picada das fêmeas dos vectores flebótomos dos géneros *Lutzomyia* (no Velho Mundo) ou *Phlebotomus*

(no Novo Mundo). Embora estes sejam classicamente aceites como vectores da doença, reconhecem-se actualmente outros invertebrados que podem fazer parte do ciclo biológico, como pulgas e carrapatos (Colombo *et al.*, 2011).

De forma simplificada, o ciclo de vida deste parasita (figura 10C) pode descrever-se a partir da inoculação das suas formas promastigotas metacíclicas por um flebótomo infectado no hospedeiro, resultando no recrutamento de neutrófilos e consequente

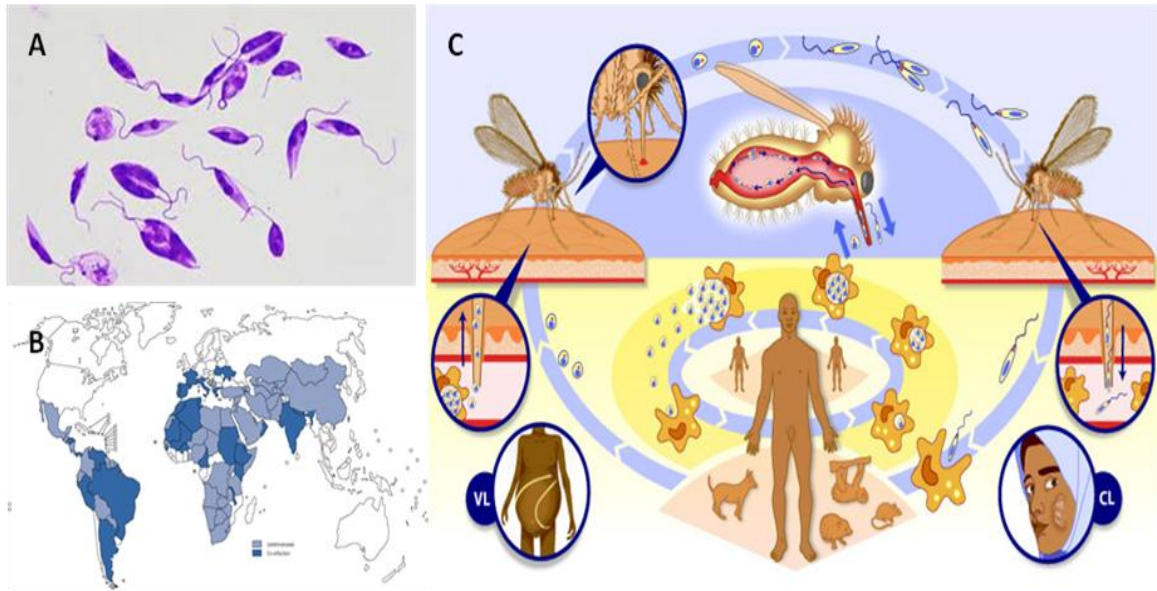


Figura 10 – Aspectos morfológicos, epidemiológicos e ciclo de vida de *Leishmania* spp. Imagem A: Fotografia de formas promastigotas de *Leishmania donovani*. © Michael Abbey para *Science Photo Library*. Imagem B: Distribuição de casos de Leishmaniose e co-infecção Leishmaniose/HIV no Mundo em 1999. © OMS 2000. Imagem C: Ciclo de vida simplificado de *Leishmania* spp. VL – Leishmaniose visceral; CL – Leishmaniose cutânea. © OMS / Wellcome Trust.

fagocitose ou internalização dos parasitas por essas células, por macrófagos residentes nos tecidos periféricos à inoculação inicial ou por células dendríticas dermais (Beattie e Kaye, 2011). Os promastigotas diferenciam-se em amastigotas no interior dos macrófagos e subsistem nos fagolisossomas ácidos onde se podem replicar activamente e provocar a ruptura dessas células, libertando novos parasitas e causando lesões nos tecidos (para as espécies cutâneas) ou em órgãos sistémicos (nas espécies visceralizantes) (Passero, 2011). Um outro flebótomo, ao fazer um repasto sanguíneo, ingere células infectadas que se multiplicam no seu intestino, se diferenciam em novas formas promastigotas – que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado – e se tornam capazes de infectar novos hospedeiros e perpetuar o ciclo (Passero, 2011).

Se o hospedeiro não apresentar um perfil imunogenético de susceptibilidade à doença, o controlo da infecção é o resultado da resposta inata dos macrófagos ou de uma resposta adaptativa efectiva com interacção de células T específicas (Beattie e Kaye, 2011), visto que o resultado de uma infecção por *Leishmania* depende dos mecanismos imunitários celulares do hospedeiro e da virulência do parasita (Rosa *et al.*, 2005).

No caso de o hospedeiro ser susceptível, o curso clínico da doença prosseguirá e manifestar-se-á sob um de quatro tipos principais. Resumidamente, na leishmaniose cutânea, formam-se habitualmente úlceras em áreas expostas da pele, como a face, os braços e as pernas. Geralmente, estas úlceras curam espontaneamente em alguns meses, deixando cicatrizes. A leishmaniose cutânea difusa produz lesões crónicas e disseminadas na pele, semelhantes àsquelas da lepra lepromatosa, sendo mais difícil de tratar que a forma cutânea da doença. Na manifestação mucocutânea da leishmaniose, as lesões podem destruir total ou parcialmente as membranas mucosas do nariz, boca e garganta e os tecidos circundantes. Finalmente, a leishmaniose visceral, também conhecida como *kala azar*, é caracterizada por febre alta, perda de peso significativa, hepato- e esplenomegalia, e anemia. Se não for tratada, esta doença pode, em dois anos, atingir uma taxa de mortalidade de 100 % (OMS, 2012).

As estimativas da OMS (2012) colocam o número de pessoas infectadas em cerca de 12 milhões, em 88 Países (figura 10B, página 20). No entanto, esta estimativa continua a ser subestimada uma vez que um número substancial de casos não é registado, já que apenas 32 dos 88 Países afectados consideram a leishmaniose como uma doença de declaração obrigatória (OMS 2012); nesses países, cerca de 2 milhões de novos casos são registados anualmente, e, a uma escala global, cerca de 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair leishmaniose (Beattie e Kay, 2011).

Historicamente, a interacção entre o parasita *Leishmania* e os seres humanos pode ser traçada até ao século VII A.C., quando o rei assírio Assurbanipal descreveu, nas suas crónicas, lesões conspícuas semelhantes àsquelas da leishmaniose cutânea, sendo as suas fontes textos datados de épocas anteriores, de entre 1500 a 2500 anos A.C. (Cox 1996).

Diversos factores moleculares concorrem para a virulência e patogenicidade das *Leishmania* sp. Um dos principais factores é uma MMP com diferentes nomes: leishmanolisina, proteína maioritária de superfície: MSP (do inglês *major surface glycoprotein*), e GP63 (Yao *et al.*, 2003). Para este estudo foi seleccionado o nome leishmanolisina

(EC3.4.24.36) uma vez que foi o nome recomendado pela IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), por reflectir o papel proteolítico deste enzima.

A leishmanolisina é o paradigma para as metaloproteinases de zinco nos protozoários cinetoplastos, sendo altamente conservada entre as diferentes espécies e possuindo os motivos estruturais característicos das metzincinas (Bangs *et al.*, 2001). No geral, a leishmanolisina é abundantemente expressa na superfície do parasita, sendo responsável pelo aumento da infectividade dos promastigotas metacíclicos através da conversão proteolítica de C3b em iC3b inactiva, evitando dessa forma tanto a lise pelo sistema complemento como a opsonização por parte do hospedeiro (Brittingham *et al.*, 1995). A mesma leishmanolisina é capaz de aumentar directamente a internalização do parasita, por agir como ligando das integrinas à superfície de macrófagos do hospedeiro (Brittingham *et al.*, 1999). Ainda, esta proteína tem um papel importante na sobrevivência do parasita no interior dos fagolisossomas dos macrófagos (El-Sayed e Donelson, 1997).

Esta MMP é homóloga à GP63 encontrada nos tripanossomas Africanos (El-Sayed e Donelson, 1997) e Americanos (Yao *et al.*, 2003), tendo estas evidências surgido com o mapeamento do genoma dos tripanossomas. Inicialmente, foram identificados pelo menos quatro genes distintos que são expressos diferencialmente nas diferentes fases do ciclo de vida deste parasita (Bangs *et al.*, 2001). Tal como as suas homólogas, a leishmanolisina foi identificada como uma metaloproteinase neutra, específica e com preferência para clivar resíduos de aminoácidos no seu terminal aminado (Bouvier *et al.*, 1990), sendo expressa numa forma glicosilada pendente de activação (Button *et al.*, 1993), e claro, sendo capaz de degradar proteínas de matriz como o fibrinogénio (MacDonald *et al.*, 1995).

Foi também sugerido (Voth *et al.*, 1998) que a leishmanolisina poderá estar ancorada à superfície do parasita através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). No entanto, sabe-se que os amastigotas da espécie *L. mexicana* secretam uma forma solúvel da leishmanolisina, localizada maioritariamente no compartimento lisossomal (Ilg *et al.*, 1993). Uma análise bioinformática mostra que a sequência dos genes que codificam para leishmanolisina em diversas espécies de *Leishmania* e que não contêm a sequência associada à âncora de GPI contêm no entanto uma outra sequência para uma região altamente carregada seguida por uma longa região hidrofóbica que poderia constituir um domínio transmembranar (Yao *et al.*, 2003). Se estas MMP são moléculas de superfície ou se estão ligadas à membrana plasmática através de um domínio transmembranar é ainda motivo de estudo e está pendente de confirmação experimental.

Finalmente, outras metaloproteinases como MMP-2 e MMP-9 (gelatinases), foram indicadas como estando relacionadas com a falha terapêutica na cura das lesões provocadas pela leishmaniose cutânea (Maretti-Mira *et al.*, 2011). A actividade aumentada de células produtoras de IFN- γ , interleucina 10 e TGF- β (factor de crescimento tumoral, do inglês *tumour growth factor*), bem como a presença de elevada actividade gelatinolítica nas zonas lesionadas ou necróticas e em alguns infiltrados granulomatosos resultantes da infecção por *Leishmania*, indicam a importância das MMP na cura ou progressão das lesões provocadas pela infecção.

Num estudo feito em cães com leishmaniose visceral, foi reportado um alto nível de MMP-9 no CSF (Marangoni *et al.*, 2011). Tal como no caso da Tripanosomose Africana, discutida anteriormente, este aumento poderá estar relacionado com a disrupção da barreira hematoencefálica e com o estado inflamatório induzido pela doença. Este resultado vem em concordância com um estudo feito por Costa *et al.* (2008) onde o aumento na produção de TGF- β coincide com o pico de actividade leishmanicida dos macrófagos perante uma co-cultura de *L. chagasi*, hepatócitos e macrófagos, e com elevada actividade de MMP-9.

1.4. Inibição da actividade de metaloproteinases

Torna-se evidente, por todas as razões supramencionadas, que a inibição farmacológica das MMP poderá ter um efeito benéfico em pacientes que sofram diferentes patologias. Existem diversas potenciais estratégias para reduzir a actividade das matrixinas, particularmente nas fases de transcrição e tradução dos genes das MMP durante a sua síntese, ou pela inibição directa da sua actividade (Hidalgo e Eckhardt, 2001; Acharya *et al.*, 2004). No entanto, apesar dos esforços empregues na síntese de novos inibidores das MMP, até à data muito poucos inibidores selectivos estão efectivamente disponíveis.

O desenvolvimento de inibidores de proteases que sejam terapêuticamente activos é um desafio. Além de ser necessário garantir que a molécula possui a potência adequada, ela também deve permanecer biodisponível, preferencialmente após toma oral (Cawston *et al.*, 1996). Após ingestão, deverá entrar na circulação sanguínea e atingir a concentração adequada nos tecidos, sendo específica para a família de enzimas que pretende atingir, sem ser antigénica e sem causar danos tóxicos (Cawston *et al.*, 1996). Vários arquétipos de inibidores, baseados em modelos tridimensionais, providenciam uma fonte de informação sobre potenciais novos fármacos, nomeadamente ao identificar os determinantes

estruturais das regiões de selectividade das MMP. Assim, a maioria dos inibidores patenteados até à data partilham três características: (1) um grupo de ligação ao zinco catalítico; (2) cadeias laterais que se ligam a diferentes locais das MMP; e (3) um esqueleto peptídico ou peptidomimético que orienta o grupo da ligação ao zinco e proporciona interacção óptima com a proteína (Pirard, 2007). Apesar da informação facultada por estes estudos ser interessante, na prática a maioria destes compostos provou ser menos útil do que originalmente pensado, uma vez que não tiveram eficácia demonstrável e causaram efeitos secundários não-negligenciáveis durante a fase III de ensaios clínicos (Morrison *et al.*, 2009). Parece claro, no entanto, que diferentes vias de inibição em diferentes pontos da actividade das MMP terão de ser prospectadas na perspectiva da inibição eficaz das MMP, especialmente tendo em conta que nem todas as MMP são deletórias numa dada patologia, e que a inibição terá de ter como alvo apenas as MMP que estão a causar dano. Este tipo de estratégia pode permitir a abordagem detrimental de algumas vias em situações onde as MMP têm um efeito duplo, salvaguardando a sua acção benéfica. A figura 11 ilustra de forma resumida as alternativas possíveis no que se refere à inibição das MMP.

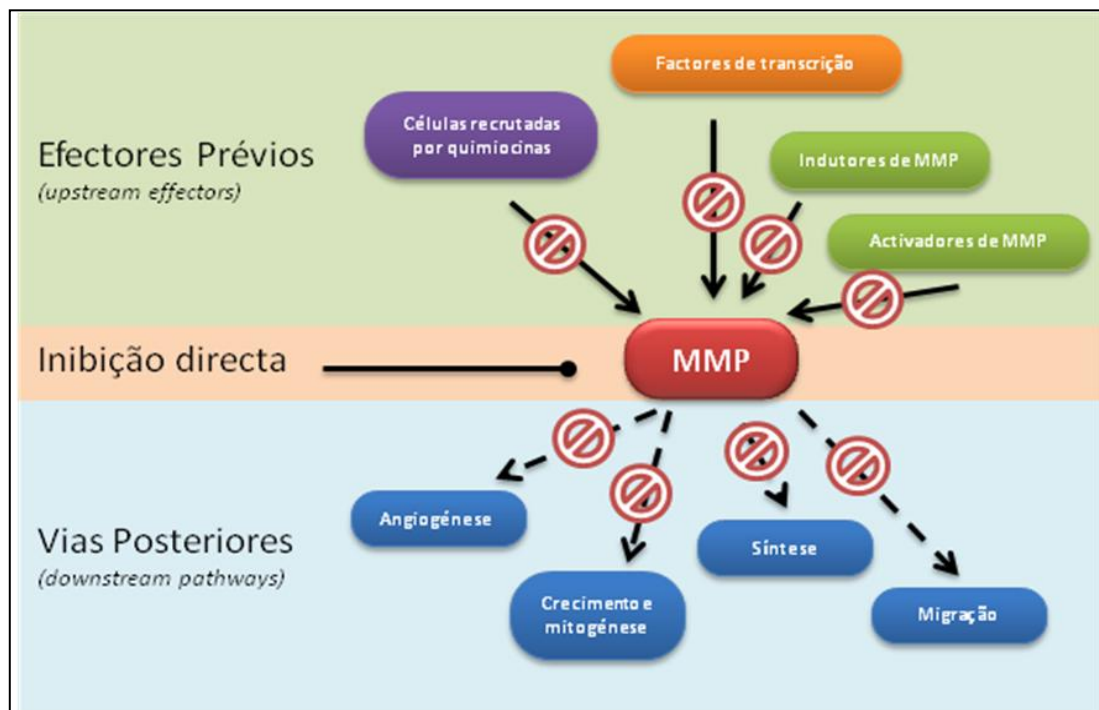


Figura 11 – Representação esquemática dos potenciais alvos na inibição das MMP. O reconhecimento de que nem todas as matrixinas ou processos por elas controlados são deletórios leva à necessidade de explorar vias alternativas para a inibição específica das MMP prejudiciais numa dada patologia. Tal poderá incluir a inibição directa das matrixinas com inibidores especificamente desenhados, ou manter como alvo as vias efectoras prévias aos processos celulares de transcrição, tradução e activação de uma determinada MMP. Além disso, uma forma mais fácil de modular a actividade de uma MMP específica será visando os componentes das vias posteriores aos processos controlados pela activação das MMP (adaptado de Morrison *et al.*, 2009).

1.4.1. Inibidores clássicos

1.4.1.1. Agentes quelantes

Após a primeira descrição da collagenase por Gross e Lapiere em 1962, trabalhos subsequentes com o intuito de caracterizar os factores que poderiam inibir esta enzima mostraram que agentes quelantes como o ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Lapiere e Gross, 1963) são capazes de inibir as MMP.

Os determinantes para esta inibição são elementares, prevenindo-se a activação da enzima (Shapiro *et al.*, 1993) através da quelação dos iões divalentes de cálcio e/ou zinco que são co-factores essenciais das matrixinas.

1.4.1.2. Antibióticos

O antibiótico tetraciclina, bem como os seus derivados, apresentam alguma actividade como inibidores de collagenases, apesar de o seu mecanismo de acção ser ainda desconhecido (Cawston, 1996). Apesar disso, o tratamento de patologias comumente motivadas por alterações na homeostasia das MMP, como a artrite reactiva, parece ter relevância clínica. De facto, não apenas o índice IC_{50} (utilizado como uma medida da eficácia da inibição alcançada por uma dado fármaco) para a doxiciclina, minociclina e tetraciclina na inibição da collagenase ronda o micromolar (Cawston, 1996), como o tratamento com doxiciclina parecer levar a uma diminuição dos níveis de collagenase produzida pelos neutrófilos (Lauhio *et al.*, 1994). Além disso, estes compostos já se encontram em comercialização e uso clínico sendo portanto passíveis de fornecer dados úteis sobre a inibição das MMP.

Estes dados são de particular importância quando se consideram os desafios que têm surgido no desenho de novos inibidores terapêuticos das matrixinas, o que se evidencia pelo facto de a doxiciclina, um antibiótico em uso desde meados do século XX, ser ainda actualmente o único fármaco aprovado pela FDA (*American Food and Drug Association*) para ser usado como inibidor de MMP (Jackobsen *et al.*, 2010). Uma das limitações dos antibióticos é o despoletar da síndrome músculo-esquelética como efeito colateral, que se caracteriza por inflexibilidade das articulações, dor, inflamação e tendinite (Jackobsen *et al.*, 2010).

1.4.2. Outros inibidores

1.4.2.1. Anticorpos e Macroglobulinas

No soro, sob a forma de macroglobulinas, é possível encontrar uma outra linha de defesa contra a actividade exacerbada das MMP (Woessner *et al.*, 1991). As α 2-macroglobulinas são proteínas de alto peso molecular (~750 kDa) produzidas pelo fígado (Szabo *et al.*, 2004), sendo um excelente substrato não apenas para as colagenases mas também para outras matrixinas, com a particularidade de ocorrer, após a proteólise, uma alteração conformacional irreversível que detém covalentemente o enzima e o impede de prosseguir a sua actividade (Sottrup-Jensen e Birkedal-Hansen 1989; Woessner *et al.*, 1991). Apesar de a actividade catalítica das MMP não ser directamente inibida pelas macroglobulinas *per se*, a sua restrição física impede o enzima de interagir com os seus substratos naturais, acabando eventualmente por sofrer endocitose e sendo permanentemente eliminados.

Assim, uma vez que as macroglobulinas abundam no plasma, têm consequentemente um papel preponderante na inibição periférica de MMPs, em contraponto com os TIMPs que possuem um papel inibidor mais localizado. Além disso, como anteriormente referido, os complexos MMP/macroglobulina são removidos por endocitose mediada, pelo que a remoção destes complexos é irreversível, e por contraponto, a inibição das MMP através de TIMPs é reversível (Sternlicht *et al.*, 2001). Além disso, os complexos MMP/macroglobulina são eliminados rapidamente da circulação periférica uma vez que são reconhecidos por receptores que reconhecem esse complexo mas são o inibidor livre.

A eliminação mediada por receptores pode também ter lugar nos tecidos visto que os fibroblastos possuem receptores deste tipo funcionais e capazes de internalizar e destruir o complexo enzima/inibidor (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

1.4.2.2. Inibidores Sintéticos

A topologia particular do local activo das MMP tem influenciado grandemente o desenho de inibidores sintéticos para estas enzimas. Na maioria das MMP, a zona de ligação ao inibidor, a cavidade S1', é uma estrutura em forma de túnel (figura 12, na próxima página), cuja profundidade, tamanho e sequência variam entre as diferentes MMP (Devel *et al.*, 2010), o que pode explicar a elevada plasticidade do seu domínio catalítico.

Interessantemente, foi sugerido que a acomodação de inibidores de grande tamanho em relação ao sítio catalítico poderá ocorrer através da deslocação da cavidade S1' em relação ao corpo da proteína (Devel *et al.*, 2010), tendo sido demonstrado que é necessária uma alteração conformacional da Tyr227, localizada na parte inferior da cavidade S1' do sítio catalítico das MMP; de facto, sem este reposicionamento, ocorre um impedimento estéreo entre o enzima e o inibidor, pelo que este resíduo de tirosina pode servir como um “*gate keeper*” da cavidade (Devel *et al.*, 2010).

Também a presença do átomo de zinco catalítico tem sido explorada como racional para o desenho de novos inibidores. De facto, o desenvolvimento da primeira geração de inibidores das MMP baseava-se numa variedade de ácido hidroxâmico, negativamente carregado, com afinidade para esse átomo de zinco (Whittaker *et al.*, 1999); um dos exemplos mais explorados é o fármaco Batimastat, actualmente utilizado como anti-metástico (Davies *et al.*, 1993).

Apesar de serem extremamente eficazes, estes péptidos hidroxamáticos possuem debilidades *in vivo*: tempo de meia-vida curto e rápida *clearance*. Por esta razão, foi necessário desenvolver novas moléculas, como o fármaco Prinomastat (Jacksoben *et al.*, 2010), com diferentes características ou com a adição de outros grupos funcionais com o intuito de conferir robustez e especificidade a essa segunda geração de potenciais inibidores de MMP (Devel *et al.*, 2010), bem como aumentar o índice terapêutico (Jacksoben *et al.*, 2010) desses potenciais fármacos. As companhias farmacêuticas possuem razões substanciais para investir nestas classes de inibidores, visto que não existem compostos hidroxamáticos em uso clínico nem patentes registadas, o que oferece um amplo leque de possibilidades.

1.4.2.3. Outros compostos

Vários compostos estão actualmente em estudo e são considerados promissores para uso como inibidores das MMP, sendo o principal interesse utilizá-los como fármacos

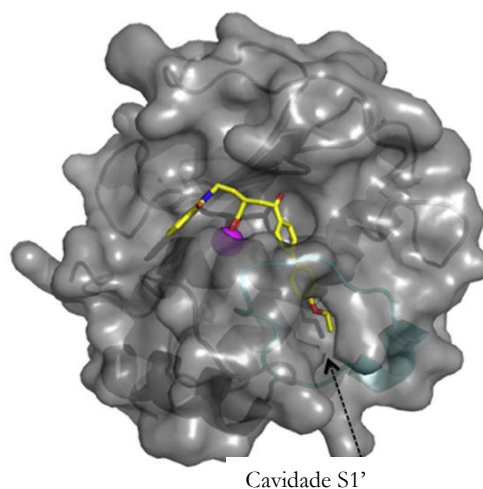


Figura 12 – MMP e um inibidor sintético. Representação da superfície do complexo MMP-12/inibidor (a amarelo). A cavidade S1' é um subsítio activo que contém uma estrutura em forma de túnel (código PDB: 1ROS). (adaptado de Devel *et al.*, 2010)

contra o cancro ou outras patologias. Neste sentido, extractos de produtos naturais têm sido testados, como por exemplo extractos da planta medicinal chinesa *Euonymus alatus*, a curcumina, um componente do açafrão, os polifenóis do chá verde (Tate *et al.*, 2004) e os seus derivados, como a epigallocatequina-3-galato (EGCG), que demonstrou ser um potente inibidor das gelatinases (Demeule *et al.*, 2000; Garbisa *et al.*, 2001). Também frutos vermelhos como framboesas, amoras e uvas moscadinas contém substâncias que inibem muito fortemente as gelatinases, o que pode contribuir para o efeito anti-tumoral das dietas ricas em fruta, nomeadamente graças ao alto teor de polifenóis dos frutos vermelhos (Tate *et al.*, 2004).

Uma observação de que os álcoois podem também ser inibidores da actividade das MMP (Mutluay *et al.*, 2011) surgiu da necessidade de dissolver em etanol alguns compostos em avaliação como potenciais inibidores de MMP, devido à sua fraca solubilidade em água.

Uma comparação entre diferentes álcoois, especificamente metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, tert-butanol, 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), 1-pentanol, hexanóis, heptanóis, octanóis, 1,2-etanodiol e 1,3-propanodiol demonstrou que existe uma relação de proporcionalidade inversa entre o peso molecular, a solubilidade e a capacidade de inibição das MMP entre os diferentes álcoois (Mutluay *et al.*, 2011), apresentando os dióis, no geral, maior capacidade inibição do que os álcoois simples e podendo essa inibição ultrapassar os 50 % (Mutluay *et al.*, 2011). Ainda, o mesmo estudo sugere que a relação entre dose-resposta das MMP solúveis pode diferir daquelas ancoradas a uma matriz.

Outros produtos naturais capazes de inibir a actividade das MMP incluem picnidionas, resveratrol, nicotinamida, ácido betulínico, rifampicina, entre outros (Verma *et al.*, 2007).

1.5. Ensaios de actividade de metaloproteinases

A escolha de um ensaio para medir a actividade de um enzima é criticamente importante e depende dos objectivos quantitativos e qualitativos do estudo. Isto é particularmente importante no caso das MMP, uma vez que os seus substratos naturais são proteínas habitualmente insolúveis (ou fracamente solúveis), misturas complexas de proteínas e macromoléculas associadas, e componentes estruturais de matrizes extracelulares. Além disso, as MMP são sintetizadas como zimogénios inactivos e

necessitam de uma activação para se tornarem enzimaticamente activas. Mais, as suas actividades são reguladas *in vivo* pelos seus inibidores endógenos.

Assim, a complexidade destas interacções obriga a que os métodos de estudo das MMP forneçam resultados onde a interferência das moléculas possivelmente contaminantes para o sistema seja minimizada, além de fornecer resultados objectivos e que sejam comparáveis entre si. Diversos métodos têm sido desenvolvidos com este propósito, e serão citados em seguida.

1.5.1. Zimografia

Uma das técnicas mais utilizadas para a análise da expressão das MMP é a zimografia, que identifica as diversas MMP através simultaneamente da degradação do seu substrato preferencial e do seu peso molecular.

Tendo sido inicialmente utilizada para detectar a actividade da uroquinase (Heussen e Dowdle, 1980), o uso da zimografia foi actualmente alargado à detecção de outras proteases, por ser um método quantitativo, funcional e simples, podendo ser usado para a determinação directa e para o estudo da distribuição espacial das MMP e dos seus inibidores (Kupai *et al.*, 2010). Baseia-se na separação electroforética de proteínas por peso molecular sob condições desnaturantes (com SDS, dodecilsulfato de sódio) mas não-redutíveis, em um gel de poliacrilamida co-polimerizado com um substrato (por exemplo caseína, gelatina, ou colagénio). Após a electroforese, o SDS do gel é trocado por um detergente não-iónico (por exemplo Triton® X-100), o que leva à renaturação parcial do enzima e recuperação da sua actividade proteolítica (Hu *et al.*, 2010; Krizkova *et al.*, 2011); adicionalmente, as MMP latentes podem ou não ser auto-activadas. Subsequentemente, o gel é incubado em um tampão de activação ou desenvolvimento apropriado, o que leva à activação dos enzimas e à concretização da sua actividade (Snoek-Van Burden *et al.*, 2005), podendo as bandas de actividade proteolítica ser detectadas como zonas mais claras num gel de fundo uniformemente azul, de substrato não-clivado, devido à coloração com um corante como o *Coomassie Brilliant Blue* (De Sousa *et al.*, 2010). Estas bandas podem então ser quantificadas em relação à sua intensidade num densitómetro.

Dependendo do substrato utilizado, diferentes MMP podem ser detectadas por zimografia, com diferentes sensibilidades. Os mais comumente utilizados são a gelatina para detectar MMP-2 e MMP-9 (Kupai *et al.*, 2010), com um limite de detecção de 10 pg (Kleiner e Stetler-Stevenson, 1994); a caseína para detectar MMP-1, MMP-7, MMP-12, e

MMP-13 (Kupai *et al.*, 2010), com um limite de detecção de 1 ng (Fernandez-Resa *et al.*, 1995); e colagénio para detectar MMP-1 e MMP-13 (Kupai *et al.*, 2010), com um limite de detecção de 0.1 pg (Gogly *et al.*, 1998).

Apesar dos problemas com a padronização dos diferentes aspectos desta técnica, desde os tempos de incubação até à quantidade de proteína que pode ser detectada, este método é largamente utilizado para a detecção e quantificação de MMP. Como explicação para este facto estão os reduzidos custos, a funcionalidade, e a sensibilidade associados à técnica, bem como o facto de ser um método quantitativo.

Uma variação deste método é a zimografia *in situ*, uma técnica relativamente pouco dispendiosa que usa um suporte ou uma sobreposição baseada num substrato enzimático para detectar e localizar uma actividade proteolítica específica em várias secções de tecido (Kupai *et al.*, 2010). Resumidamente, um substrato específico para uma determinada protease(s) é depositado sob ou sobre uma secção criopreservada de um tecido não-fixado. Durante o período de incubação, o substrato será digerido de forma tempo e dose-dependente pelo enzima apropriada na sua localização nativa. Após o período de incubação, a lise do substrato marcado pode ser detectada por microscopia óptica ou de fluorescência (de acordo com o tipo de substrato), permitindo assim a localização da actividade proteolítica específica na secção de tecido (Yan e Blomme, 2003; Lombard *et al.*, 2005). No entanto, a zimografia *in situ* tem duas grandes desvantagens: a primeira, a sensibilidade para a detecção da redução de intensidade de uma coloração é baixa; a segunda, o facto de esta técnica não ser quantitativa (Mungall e Pollitt, 2001).

Outra variação é a zimografia reversa, através da qual se detectam não as MMP mas os seus inibidores (Hawkes *et al.*, 2010). Neste método, além do substrato, é incorporado no gel de poliacrilamida uma MMP (usualmente MMP-2). Durante a fase de activação após a electroforese, o enzima apenas digere o substrato nas áreas onde os inibidores não estão presentes. Assim, após coloração, o gel será incolor excepto nas zonas onde existem os inibidores e portanto não houve clivagem proteolítica do substrato. Nestas bandas, a inibição terá uma estequiometria 1:1, e uma vez que o SDS presente no gel dissocia quaisquer inibidores ligados às MMP, a concentração total de inibidores na amostra pode ser detectada (Snoek-VanBurden *et al.*, 2005).

1.5.2. Outros métodos

Os ensaios com vista à determinação de MMP com objectivos clínicos e de investigação estão descritos em diferentes revisões na literatura, onde é manifesto o interesse em estudar as funções biológicas destes enzimas e em ultrapassar as dissemelhanças metodológicas que tornam mais difícil comparar resultados entre diferentes estudos. Devido a este facto, outros métodos além da zimografia têm sido desenvolvidos para avaliar as MMP presentes numa amostra.

Os métodos enzimáticos *in vitro*, como os ensaios enzimáticos com imunoadsorção, vulgo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), especialmente sob a forma de *kits* comerciais, estão amplamente disponíveis. A maior desvantagem destes *kits* é o facto de, apesar de quantificarem efectivamente a concentração de MMP presente, não medirem a sua actividade enzimática. Além disso, este método não suporta a detecção de dímeros de MMP, que possuem importância crescente nas doenças associadas com matrixinas e poderão ter também implicações no desenho de novos fármacos (Kupai *et al.*, 2010). Os ensaios de ELISA segundo protocolos *in house*, mais comuns, foram também otimizados para detectar MMP. Os protocolos utilizados diferem no tipo de anticorpos utilizados e na própria técnica, existindo inclusivamente anticorpos monoclonais e substratos peptídicos marcados (por exemplo metoxicoumarina) que detectam MMP imobilizadas (Cheng *et al.*, 2008).

Os métodos fluorimétricos que utilizam substratos marcados com fluoróforos para detecção e/ou determinação de diferentes MMP também são utilizados, principalmente na implementação em rastreios em placas de microtitulação (onde inúmeras amostras são avaliadas concomitantemente) (Krizkova *et al.*, 2011). A actual disponibilidade de diversas sondas fluorescentes, incluindo sondas que emitem sinal em comprimentos de onda próximos do infravermelho, possibilita a detecção e a quantificação simultânea de diferentes tipos de MMP (Weissleder *et al.*, 1999). O uso de substratos marcados com fluoróforos também é benéfico para a monitorização da actividade das MMP em tempo real, sem necessidade de parar a reacção; um exemplo desta metodologia é o uso da sonda FITC (do inglês *Fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína).

Outra técnica para avaliar a actividade enzimática das MMP com recurso a fluorescência utiliza péptidos sintéticos, cuja sequência mimetiza o local de clivagem dos substratos naturais das MMP, marcadas com fluoróforos e *quenchers* nos extremos opostos do péptido. Quando este é clivado, os dois grupos separam-se fisicamente e em resultado o

sinal de fluorescência aumenta exponencialmente. Este método denomina-se FRET, do inglês *Fluorescence resonance energy transfer*, ou seja, transferência da energia de ressonância de fluorescência, e é um ensaio simples e conveniente para detectar a actividade da maioria das MMP, sendo igualmente possível adaptá-lo a um formato de maior escala, utilizando por exemplo placas de microtitulação com 384 ou 1536 poços. Por outro lado, existe uma clara desvantagem neste ensaio, que é o facto de a sequência sintética ser diferente da do substrato nativo, pelo que a mimetização será sempre imperfeita e reflectindo apenas parcialmente a verdadeira interacção entre o enzima e o seu substrato nativo (Kupai *et al.*, 2010).

Também a metodologia de *Western-blotting* pode ser usada para analisar MMP em estudos clínicos ou de investigação. No entanto, este método consome bastante tempo e requer, além disso, disponibilidade de anticorpos bem como a inibição da actividade de enzimas proteolíticas dos analitos durante o processo de bloqueio e das reacções imunoquímicas. Para o desenvolvimento da reacção são utilizados anticorpos biotinilados e a quimioluminescência pode ser quantificada utilizando *software* específico (Krizkova *et al.*, 2011). Da mesma forma, os ensaios de imunocaptura baseados no uso de anticorpos específicos contra MMP e a capacidade de alguns reagentes (como por exemplo o acetato de 4-aminofenilmercúrio, ou a pro-uroquinase modificada) em activar MMP imobilizadas (Krizkova *et al.*, 2011) podem ser utilizados para rastrear um grande número de amostras ou compostos.

Na detecção de MMP, é extremamente importante alcançar elevadas selectividade e especificidade. É possível atingir-se um compromisso entre estes dois determinantes utilizando o sistema conhecidos como múltiplas enzimas/múltiplos reagentes (MEMRAS) (Cheng *et al.*, 2008). Este método avalia a actividade das matrixinas em meio líquido com recurso a substratos fluorogénicos com diferentes perfis de selecção para diversas MMP; esta é uma abordagem vantajosa no que diz respeito à detecção da actividade destes enzimas em amostras biológicas como fluidos corporais (Ramussen *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2008). A medição da taxa de reacção como função da alteração da fluorescência ao longo do tempo para cada substrato conduz a um sistema de equações múltiplo, com concentrações desconhecidas de MMP. A resolução do sistema de equações determina a detecção da actividade de cada uma das MMP presentes (Ramussen *et al.*, 2004; Krizkova *et al.*, 2011).

A imunocitoquímica também pode ser utilizada na detecção de MMP em células e tecidos. Estudos confirmaram que MMP podem ser detectadas em secções de tecidos fixados por imersão em parafina, usando anticorpos policlonais; estes tecidos podem ser corados usando *kits* de coloração e hematoxilina (Krizkova *et al.*, 2011). Este método é altamente demonstrativo, porém a utilização de microscopia óptica impõe algumas limitações a esta técnica. Estas limitações podem ser contornadas, até certo ponto, utilizando microscopia electrónica (Krizkova *et al.*, 2011), que evidencia inclusive uma maior co-distribuição das matrizes de substrato e correspondentes enzimas proteolíticas. No entanto, o uso combinado de anticorpos, técnicas imagiológicas e/ou electroquímicas sofisticadas, e nano- ou micropartículas poderá ser, futuramente, uma das técnicas mais utilizadas na análise imunohistoquímica de MMP (Munge *et al.*, 2010).

2. Objectivos

Com o anteriormente exposto, propõe-se como objectivo geral do estudo a caracterização bioquímica da expressão de metaloproteinases de matriz em dois parasitas tripanosomatídeos, *T. b. brucei* e *L. infantum*.

São propostos como objectivos específicos:

- (1) Caracterizar zimograficamente as metaloproteinases de *T. b. brucei* e *L. infantum* a partir de extractos de proteína total;
- (2) Avaliar a actividade inibitória de inibidores de proteases na actividade zimográfica das metaloproteinases dos dois parasitas;
- (3) Comparar de forma crítica, qualitativa e semi-quantitativamente, as propriedades das metaloproteinases e apontar possíveis alvos quimioterapêuticos contra *T. b. brucei* e *L. infantum*;
- (4) Averiguar, com recurso a ferramentas bioinformáticas, a relação entre metaloproteinases de diferentes parasitas da família *Trypanosomatidae*.
- (5) Relacionar os resultados obtidos a partir dos objectivos anteriores com as propriedades individuais das metaloproteinases dos parasitas estudados.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção de extractos de parasitas

3.1.1. Extracto de *T. b. brucei*

Para a obtenção do extracto de *T. b. brucei*, quatro murganhos BALB/c com 6 semanas de idade foram obtidos e mantidos nos serviços de Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, de acordo com os requerimentos da União Europeia (86/609/CEE) reconhecidos pela lei Portuguesa (DR DL129/92 e Portaria 1005/92). Os animais foram infectados intraperitonealmente com parasitas *T. b. brucei* estirpe JA-C6-931018, derivados de um isolado originalmente obtido de um gnu selvagem no Serengueti em 1966. Após 5 dias de infecção, presumivelmente no pico máximo de parasitémia média (Donelson *et al.*, 1998; Drennan *et al.*, 2005) e após confirmação de infecção sistémica por microscopia óptica numa ampliação de 40x, os animais foram sacrificados para colecta de sangue por punção cardíaca, sendo as formas sanguíneas do parasita purificadas com recurso a cromatografia de troca aniónica numa matriz de DEAE (dietilaminoetanol)-Sepharese® *Fast Flow* (Amersham Pharmacia Biotech, Estados Unidos da América), segundo o protocolo originalmente estabelecido por Lanham e Godfrey (1970). Este método permite obter um extracto total de tripanossomas purificados dos restantes elementos sanguíneos. As fracções obtidas por eluição da coluna com PBS-glicose 20 mM são observadas por microscopia óptica e a presença de parasitas é verificada. As fracções contendo parasitas são lavadas com PBS-Glicose 20 mM, por centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, três vezes, e finalmente ressuspensas em PBS e guardadas em alíquotas a -80 °C até serem utilizadas (De Sousa *et al.*, 2010).

3.1.2. Extracto de *L. infantum*

O extracto de *L. infantum* utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Gabriela Santos Gomes (Unidade de Parasitologia, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Portugal), tendo as formas promastigotas não-virulentas da estirpe MON-1 (MHOM/PT/89/IMT151) utilizadas neste trabalho sido mantidas *in vitro* em meio Schneider (Sigma, Alemanha) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (Sigma, Alemanha) a 24 °C. Os parasitas foram lavados três vezes em PBS por centrifugação a 925 x g durante 15 minutos, ressuspensos em PBS e sujeitos a seis ciclos de congelação e descongelação (- 20 °C, - 70 °C, temperatura ambiente), seguida de uma nova centrifugação

a 925 x g. Finalmente, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados em alíquotas, a - 20 °C, até serem utilizados. Este processo produz uma lise mecânica dos parasitas, sendo desta forma conseguido um extracto total de proteínas.

3.2. Determinação da concentração dos extractos

A determinação da concentração dos diferentes extractos utilizados foi efectuada com recurso ao método de Bradford, onde a concentração da amostra é determinada por colorimetria, por comparação com uma curva tríplice de calibração com concentrações conhecidas e pré-determinadas de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma, USA). Para a curva de calibração, realizaram-se diluições seriadas de uma solução de BSA em PBS utilizando uma placa de microtitulação (NUNC), para um volume por poço de 150 µL e concentrações de BSA a variarem de 2 mg/mL a 0 mg/mL. As amostras são testadas em três diferentes diluições (1:30, 1:15 e 1:10) em PBS com o intuito de aumentar a sensibilidade do protocolo. A todos os poços são adicionados 150 µL da solução comercial de Bradford (BioRad, USA), perfazendo um volume final de 300 µL. Devido à falta de um filtro para o comprimento de onda ideal para a leitura, as placas foram lidas a 655 nm, após um período de incubação de 30 minutos durante os quais as placas são protegidas da luz.

3.3. Perfil electroforético das proteínas

Para obter uma imagem do perfil electroforético e peso molecular das proteínas mais abundantes nos extractos em estudo, foram efectuadas electroforeses em gel de acrilamida. Os géis foram preparados de acordo com os protocolos habituais para separação com protocolos de Tris/Glicina, sendo a matriz de poliacrilamida preparada a 10 %. As amostras são preparadas por mistura com Tampão de Carregamento de Amostra Proteica [100 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % (v/v) β-mercaptoetanol, 4 % (p/v) SDS, 0.2 % (p/v) azul de bromofenol e 20 % (v/v) glicerol], numa proporção de 1:1, seguida de imersão em água a 90 °C por 5 minutos. Após aplicação de concentrações conhecidas nos géis, estes são submetidos a uma corrente eléctrica de 100 V durante aproximadamente 2 a 3 horas, até a frente de corrida se aproximar do final do gel, à temperatura ambiente. Finda a corrida, os géis são corados durante 30 minutos com o corante Coomassie *Brilliant Blue* R-250, à temperatura ambiente e com agitação suave, e finalmente descorados com solução descorante consistindo em 10 % (v/v) metanol:5 % (v/v) ácido acético, durante tempo suficiente para que as bandas de proteína possam ser claramente visualizadas em azul-

escuro contra um fundo claro. Padrões de peso molecular (HyperPAGE *Prestained Protein Marker*, Bioline, Reino Unido) foram utilizados para estimar o peso molecular das proteínas electroforeticamente separáveis.

3.4. Zimografia para Metaloproteinases

3.4.1. Ensaio de Actividade

Tendo em vista a análise dos substratos e actividades proteolíticas das matrixinas dos diferentes patogéneos e linhagens celulares de interesse neste estudo, o método escolhido para atingir este objectivo foi a zimografia, pelas vantagens descritas anteriormente neste texto, sob o ponto 1.4.1 da Introdução. Todos os reagentes utilizados nestes protocolos, excepto indicação em contrário, foram adquiridos à Sigma (USA).

O gel de corrida foi preparado para conter 12 % de poliacrilamida, tendo sido co-polimerizado na presença de 2 mg/mL de uma de duas diferentes proteínas de matriz: gelatina ou caseína. As amostras, consistindo em lisados de *Trypanosoma brucei brucei* ou *Leishmania infantum*, não são reduzidas nem fervidas, sendo diluídas na proporção de 1:1 em tampão de amostra de zimografia [62.5 mM Tris-HCl, pH6.8; 5 % (v/v) glicerol; 4 % (w/v) SDS; 0.01 % (w/v) azul de bromofenol] e aplicadas no gel em concentrações conhecidas, previamente determinadas. A separação electroforética das proteínas ocorre a 100 V, a uma temperatura constante de 4 °C, em tampão de corrida (Tris/Glicina). Após a electroforese, os géis foram brevemente lavados com água destilada e em seguida incubados com tampão de renaturação [2.5 % (v/v) Triton X-100] durante 1 hora, a temperatura ambiente e com agitação suave, a fim de remover o SDS e renaturar os enzimas. Os géis são em seguida incubados durante pelo menos 12 horas a 37 °C em tampão de desenvolvimento de zimografia [0.5 M Tris-HCl, pH 7.5; 200 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 0.02 % (w/v) Brij-35]. Os géis são posteriormente corados com 0.1 % *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (BioRad, USA) em água:metanol:ácido acético (5:5:1, v/v) durante 3 horas e o excesso de corante é retirado com 10 % (v/v) metanol:5 % (v/v) ácido acético até que as bandas de proteólise possam ser claramente visualizadas. Bandas claras de lise de substrato contra um fundo azul de corante são indicativas de actividade proteolítica. Padrões de peso molecular (HyperPAGE *Prestained Protein Marker*, Bioline, Reino Unido) foram utilizados, consistindo em nove proteínas recombinantes purificadas com pesos moleculares compreendidos entre 10 e 190 kDa.

3.4.2. Ensaios de Inibição

Para os ensaios de inibição, concentrações apropriadas de diferentes inibidores a serem testados foram adicionadas ao Tampão de Desenvolvimento de Zimografia e deixadas nas mesmas condições descritas acima, sob o ponto 3.4.1 deste capítulo. Foram feitas zimografias de inibição com todos os inibidores listados na tabela 2.

A selecção dos inibidores obedeceu a critérios relacionados com o seu mecanismo de acção sobre as MMP e as concentrações utilizadas, tendo como base a literatura disponível – conforme apontado na Tabela 2 – que é também indicativa das concentrações utilizadas neste trabalho e do mecanismo de acção de cada inibidor utilizado. Os inibidores seleccionados foram: EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), EGTA (ácido etilenoglicoltetracético), tetraciclina, doxiciclina, fenantrolina, DTT (ditiotreitól) e PMSF (fluoreto de polimetilsulfonil).

Tabela 2 – Mecanismo de acção e concentração de trabalho dos diferentes inibidores utilizados.

Inibidor	Mecanismo de Acção	Classe de MMP inibida	Concentrações utilizadas	Referências
EDTA	Quelante Ca^{2+}	Todas	5 – 800 mM	De Sousa <i>et al.</i> , 2010
EGTA	Quelante Mg^{2+}	Todas	5 – 800 mM	De Sousa <i>et al.</i> , 2010
Tetraciclina	Scavenger de ROS	Gelatinases	200 mM – 2 M	Ryan e Ashley, 1998
Doxiciclina	Destabilização do mRNA	Gelatinases, Colagenases	1 μM – 1 mM	Liu <i>et al.</i> , 2003
Fenantrolina	Quelante Zn^{2+}	Todas	1 – 400 mM	Brul <i>et al.</i> , 1997
DTT	Agente redutor	Cisteínoprotease	1 – 10 mM	De Sousa <i>et al.</i> , 2010
PMSF	Inactivação do sítio activo	Serinoprotease	50 μM – 1 mM	Owen <i>et al.</i> , 2003

Nota: ROS – espécies reactivas de oxigénio; mRNA – ácido ribonucleico mensageiro.

Importa referir que para os ensaios de inibição, foram utilizadas as concentrações mínimas de extracto proteico total que demonstraram ser detectáveis por zimografia. Para esse efeito foram inicialmente efectuadas optimizações onde massas crescentes de cada extracto foram sujeitas a ensaios zimográficos de actividade, tanto em gelatina como em caseína.

3.5 Análise Bioinformática

O genoma de três tripanosomatídeos — *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major* — foram sequenciados até à data (respectivamente Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005). Apesar destes três tripanosomatídeos diferirem nos seus principais factores de virulência, existe uma metaloproteinase comum na interacção destes parasitas com os seus respectivos hospedeiros: a protease GP63 (Santos *et al.*, 2006;

Yao 2010). Esta matrixina foi assim selecionada como alvo da análise bioinformática.

3.5.1 Colecção de dados

Quarenta das múltiplas sequências anotadas como “GP63” em quatro espécies de interesse (*T. b. brucei*, *T. cruzi*, *L. major*, *L. infantum*) foram prospectadas e selecionadas das bases de dados GenBank, Refseq/NCBI, EMBL, DDBJ, PDB e Swiss-Prot à data de 20 de Junho de 2012. A tabela 3 resume os dados mais importantes em relação a estas sequências.

Tabela 3 – Resumo das informações relativas às 40 sequências utilizadas para a análise bioinformática.

#	GI	Tamanho (aa)	Tamanho calculado (kDa)	Denominação	Espécie e estirpe
1	157865343	602	63910	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania major</i> Friedlin
2	157865339	602	63838	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania major</i> Friedlin
3	157865341	602	69147	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania major</i> Friedlin
4	157865337	644	63808	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania major</i> Friedlin
5	70803027	602	nd	major surface protease gp63, putative	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
6	70803025	587	nd	major surface protease gp63, putative	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
7	70803028	581	nd	major surface protease gp63, putative	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
8	72392395	587	63612	major surface protease gp63	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
9	72392391	587	63486	major surface protease gp63	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
10	71755809	587	73199	major surface protease A	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
11	72392393	587	63486	major surface protease gp63	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
12	72392389	581	62844	major surface protease gp63	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
13	71756043	598	67584	major surface protease Gp63	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
14	71746880	763	65558	major surface protease GP63	<i>T. brucei brucei</i> 927/4 GUTat10.1
15	321399015	598	63541	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
16	321399013	763	81517	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
17	321399011	599	63812	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
18	134067787	641	69009	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
19	68124675	602	64040	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania major</i> Friedlin
20	68124673	602	63969	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania major</i> Friedlin
21	321399012	599	63848	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
22	68124674	644	69278	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania major</i> Friedlin
23	68124672	602	63939	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania major</i> Friedlin
24	339897013	599	63410	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
25	339897009	763	81386	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
26	339897005	599	63682	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
27	339897007	599	63718	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
28	146079131	641	68879	GP63, leishmanolysin	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
29	259011719	602	nd	GP63	<i>Leishmania major</i>
30	2761012	644	nd	leishmanolysin	<i>Leishmania major</i>
31	71649206	542	58884	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
32	71424023	360	39760	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
33	71418357	567	62238	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
34	71416296	567	62354	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
35	71416183	567	62422	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
36	71413695	600	65975	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
37	71407496	567	62502	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
38	71406046	565	62146	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
39	71403182	543	58962	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener
40	71402215	565	62277	surface protease GP63	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener

Nota: A numeração da primeira coluna é meramente ordinal. A sequência indicada como #1 é a sequência de referência. Todas as entradas correspondem à sequência primária da proteína. GI, “GenInfo Identifier” – identificação da sequência no Banco de Dados NCBI; aa, “número de aminoácidos”; nd, “não definido”.

3.5.2 Alinhamento

O alinhamento das sequências de interesse foi feito com recurso ao *software* BLASTp, versão 2.2.27, configurado com a matriz Blosun62 (Altschul *et al.*, 2005) e os restantes parâmetros de configuração padrão pré-definidos no programa. A sequência consenso contra as quais as restantes foram alinhadas corresponde à sequência de *L. major* com o número de acesso *gi_157865343*, referenciada como “GP63, leishmanolisina [*Leishmania major* estirpe *Friedlin*]”. Seguidamente ao alinhamento básico foi executado um alinhamento múltiplo com recurso ao *software* COBALT, utilizando as configurações pré-definidas no programa (anexo 2). Foi igualmente estimada a divergência evolucionária entre as sequências, por consideração da taxa de substituição de aminoácidos. A análise foi executada tendo como base o modelo corrigido de Poisson, com eliminação de todas as posições contendo *gaps*, utilizando o *software* MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

3.5.3 Pesquisa de domínios conservados

Após o alinhamento das sequências, foi feita a pesquisa de domínios conservados com recurso à base de dados de domínios conservados (CDD – do inglês *Conserved Domain Database*), disponível no *website* do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI. A identificação de domínios conservados é muitas vezes indicativa da função celular ou molecular de uma determinada proteína, podendo ainda revelar traços da história evolutiva de um conjunto de proteínas relacionadas (Marchler-Bauer *et al.*, 2011).

3.5.4 Análise filogenética

Foi construída uma árvore filogenética baseada no alinhamento das quarenta sequências selecionadas. Foi usado o método de *Maximum Likelihood* implementado no *software* MEGA versão 5.05, testado com *bootstrapping* usando 100 réplicas dos dados, e com um critério de inclusão de 85 % para o modelo de Jones-Taylor-Thornton com eliminação de todas as posições contendo *gaps* (Tamura *et al.*, 2011).

3.5.5 Teste de selecção positiva

A análise evolutiva da protease GP63 nas três espécies de interesse permite detectar, usando o modelo *branch-site*, acontecimentos de selecção positiva nas sequências alvo. Com os parâmetros do programa nos valores recomendados para a respectiva análise

(modelo empírico de Bayes, Yang *et al.*, 2005), foi usado o *software* Codeml no pacote PAML com o intuito de analisar a protease GP63 nas espécies de interesse.

4. Resultados e Discussão

Para a consecução dos objectivos propostos neste trabalho, o primeiro passo consistiu na produção do extracto total de proteínas dos diferentes parasitas a serem utilizados nos zimogramas de actividade e de inibição. Em relação ao extracto de *T. brucei*, tinha já sido descrito (De Sousa *et al.*, 2010) que a purificação pelo método de cromatografia de troca aniónica em DEAE/Sepharose é eficiente e parece produzir um extracto livre de elementos sanguíneos provenientes do hospedeiro murino (figura 13).

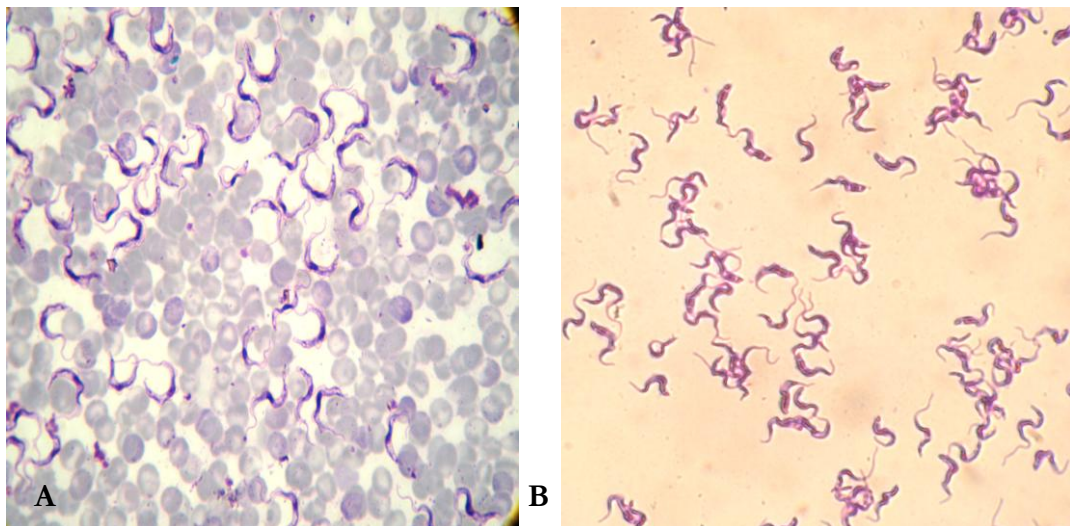


Figura 13 – Aspectos microscópicos da purificação dos parasitas da espécie *T. b. brucei* a partir de sangue total de murganho. Imagem A: Parasitas no sangue, previamente à purificação. Imagem B: Parasitas eluídos em PBS após passagem pela coluna de cromatografia de troca aniónica em DEAE/Sepharose. Imagens obtidas por microscopia óptica a partir de um microscópio Leitz Biomed, ampliação de 100x, em lâminas coradas pelo método de Giemsa. © fotos: Karina de Sousa.

Pela análise da figura 13, podemos inferir não apenas que a purificação foi efectuada com sucesso como também limitar grandemente a possibilidade de interferência de metaloproteinases do soro ou de algum elemento sanguíneo nos ensaios de zimografia posteriores a este processamento.

Quanto ao extracto de *L. infantum*, a sua purificação foi conseguida por meio de centrifugação, encontrando-se este processo bem estabelecido na literatura (Rosa *et al.*, 2005).

Uma vez em posse dos extractos, é conveniente que a concentração total de proteínas fosse conhecida, para que a massa total de extracto proteico analisada seja comparável entre os diferentes ensaios. A determinação da concentração dos diferentes extractos de parasitas utilizados foi efectuada com recurso ao método de Bradford, onde a

concentração da amostra é determinada por colorimetria, por comparação com uma curva tríplice de calibração com concentrações conhecidas e pré-determinadas de BSA. O resultado da reacção de colorimetria pode ser transformado numa recta de equação $y=mx+b$, onde y corresponde à Absorvância medida a 655 nm e x corresponde à concentração de proteína. Assim, para os diferentes extractos, foram obtidas as seguintes concentrações: *T. b. brucei*: 2,4 mg/mL; *L. infantum*: 4,7 mg/mL.

A reacção de Bradford tem sido amplamente aplicada para determinação de proteínas totais e baseia-se na interacção entre o corante Coomassie *Brilliant Blue* R-250 e macromoléculas de proteínas que contém na sua composição aminoácidos de cadeias laterais alcalinas ou aromáticas. No pH de reacção, a interacção entre a proteína e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica (Zaia *et al.*, 1998), deslocando o pico de absorvância máxima de 465 para 595 nm como resultado da estabilização do corante (Noble e Bailey, 2009). A maior parte do sinal observado é atribuível à interacção com resíduos de arginina, resultando na variação característica que é observável entre diferentes proteínas quando submetidas a quantificação por este método. No entanto, três factores garantem a robustez deste ensaio na determinação da concentração de proteínas nos extractos utilizados: a sensibilidade, a especificidade e a reprodutibilidade do método. Estes três factores determinaram a aceitação dos resultados para a consecução dos trabalhos aqui descritos. No entanto é importante referir que, esperando-se uma elevada concentração de proteína nestes extractos, dever-se-ia ter utilizado o método de quantificação de Lowry; não tendo sido possível utilizar este método, é possível que as concentrações aqui encontradas se encontrem subestimadas. Esta subestimação é ainda mais pronunciada tendo em conta que a leitura foi feita a 655 nm, isto é, fora do comprimento de onda ideal para este protocolo (595 nm).

Seguidamente, com o intuito de averiguar as proporções relativas de proteínas em cada extracto, estes foram submetidos a separação electroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito sob o ponto 3.3 deste trabalho e cujos resultados se encontram apresentados na figura 14 (próxima página).

Os resultados obtidos mostram que o padrão proteico bruto dos extractos de parasitas apresentam padrões distintos na sua generalidade, apesar de serem observáveis algumas bandas semelhantes entre si, possivelmente correspondentes a proteínas comuns à família *Trypanosomatidea* à qual os dois parasitas em estudo pertencem.

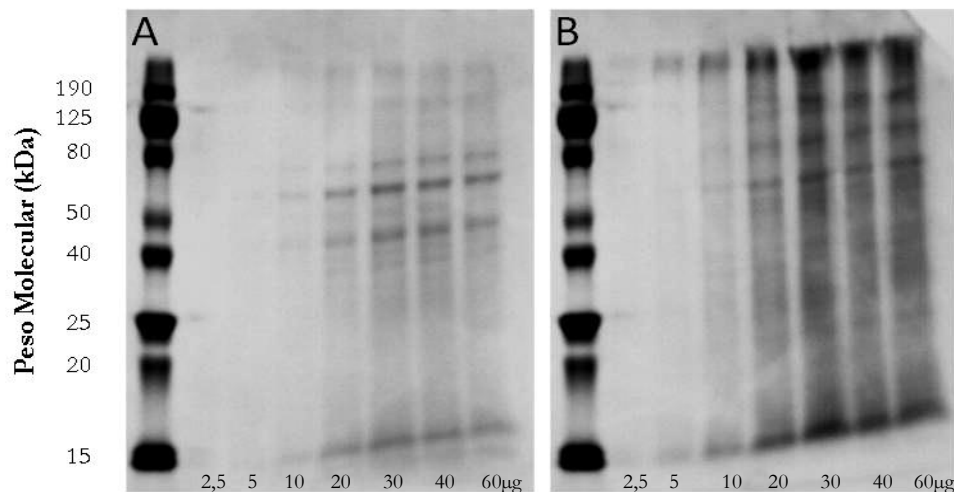


Figura 14: Perfil electroforético em condições desnaturantes dos extractos utilizados neste trabalho. A preceder a imagem A está a representação do marcador de peso molecular (HyperPAGE Prestained Protein Marker, Bioline, Reino Unido). Cada imagem corresponde a massas crescentes de extracto proteico total num gel desnaturante com 12 % acrilamida. Imagem 14A – *T. b. brucei*; imagem 14B – *L. infantum*. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue*.

Em *T. brucei* (figura 14A), a banda de maior intensidade tem um peso molecular entre 50 e 80 kDa, seguida de perto em termos de intensidade por outra com peso molecular ligeiramente superior a 40 kDa. Para *L. infantum* (figura 14B), as bandas mais relevantes apresentam peso superior a 40 kDa, existindo aparentemente 3 bandas de igual intensidade com pesos moleculares aproximados de 125, 80 e 70 kDa. Claro que estas bandas não representam uma única população de proteínas, mas antes um conjunto de proteínas com idêntico ou muito próximo peso molecular. Também digna de referência é presença de proteínas de elevado peso molecular (superior a 190 kDa) no perfil electroforético de *L. infantum*, quando corado com *Coomassie Blue*, que não parecem existir (ou existir em muito menor quantidade) no extracto de *T. brucei*; essa diferença poderá ser reflexo do ciclo biológico diferenciado dos dois parasitas. Similarmente, parece haver um maior número de proteínas de muito baixo peso molecular (inferior a 15 kDa) no extracto de *L. infantum* quando comparado com o extracto de *T. brucei*.

Comparando, entre os dois extractos, os resultados electroforéticos para a mesma massa de proteína total aplicada no gel (por exemplo, na *lane* correspondente a 30 µg), a comparação entre os níveis de expressão de proteínas pode ser inferida, mas não permite conclusões absolutas sem algum tipo de quantificação automatizada. O conjunto de resultados decorrente da observação dos géis de SDS-PAGE, acima referidos, poderá ser

mais expressivo aquando da sua comparação com os resultados de zimografia, pois a quantidade relativa de proteína em cada extracto poderá não ser necessariamente indicativa da sua capacidade proteolítica contra diferentes substratos.

Em termos de zimografia, foram inicialmente efectuados ensaios de optimização onde massas crescentes de cada extracto (variando entre 2 e 60 µg) foram sujeitas a ensaios zimográficos de actividade, tanto em gelatina como em caseína. Estes ensaios tiveram como objectivo a determinação da massa mínima de extracto proteico total capaz de gerar uma banda visível de actividade contra cada um dos substratos. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 4.

Tabela 4. Concentrações e massas de proteína utilizadas em cada extracto em estudo.

Organismo	Substrato	Concentração proteica total no extracto	Massa de proteína testada por ensaio zimográfico de actividade	Massa mínima de proteína com actividade detectável*
<i>T. b. brucei</i>	<i>Gelatina</i>	2.4 mg/mL	2 – 60 µg	10 µg
	<i>Caseína</i>	2.4 mg/mL	2 – 60 µg	10 µg
<i>L. infantum</i>	<i>Gelatina</i>	4.7 mg/mL	2 – 60 µg	2 µg
	<i>Caseína</i>	4.7 mg/mL	2 – 60 µg	2 µg

*Nota: Esta massa mínima foi em seguida utilizada nos ensaios de inibição.

Interessantemente, a massa de proteína total necessária para desencadear actividade proteolítica detectável não pareceu variar entre os dois substratos testados.

A comparação dos resultados obtidos pela dedução da concentração proteica por quantificação colorimétrica, separação electroforética de proteínas por SDS-PAGE, e ensaio de actividades proteolíticas por zimografia pode portanto produzir observações interessantes. De facto, para citar o caso de *L. infantum*, 2 µg de massa total de proteína foram suficientes para produzir uma banda visível de actividade proteolítica nos géis de caseína e de gelatina com uma concentração de substrato de 2 mg/mL; mais, é necessário ter em conta que nem toda essa massa de 2 µg corresponde a metaloproteinases (activas ou não). Assim, é possível inferir-se que uma concentração muito reduzida de matrixinas de *L. infantum* activas é necessária para obter lise destes substratos. Este resultado torna-se mais óbvio quando comparamos com os resultados obtidos para *T. b. brucei*, onde é necessária uma massa de proteína total cinco vezes superior (10 µg) para obter o mesmo nível de proteólise. Esta observação pode dever-se a diversos factores – desde genéticos a biológicos – nomeadamente o nível de expressão génica das matrixinas, o seu nível de

activação biológica, presença ou ausência de inibidores endógenos na preparação do extracto total, a fase do ciclo de vida do parasita, ou mesmo as suas características biológicas intrínsecas. No entanto, parece seguro sugerir que a capacidade de cada extracto em lisar proteínas de matriz não é directamente proporcional à concentração ou massa de proteína bruta em cada extracto, sendo antes função de múltiplos factores.

Estes resultados, porém, estão longe daqueles citados na literatura, por exemplo no caso da utilização da zimografia com gelatina para detectar MMP-2 e MMP-9 com um limite de detecção de 10 pg (Kleiner e Stetler-Stevenson, 1994). No entanto estes estudos foram efectuados com matrixinas purificadas, sendo portanto pouco razoável esperar que um extracto total de proteínas produzido a partir da lise de parasitas seja comparável em termos de actividade.

Os resultados obtidos por zimografia (figura 15) mostram que os dois extractos de protozoários têm actividades diferenciadas sobre os substratos estudados, como seria expectável. De facto, considerando primeiramente a actividade sobre gelatina (figura 15, imagens A e B), observam-se bandas de actividade (gelatino)lítica, para os extractos de parasitas estudados, com massas moleculares variáveis. No caso de *T. b. brucei*, observa-se uma banda com peso molecular aproximado de 40 kDa, enquanto para *L. infantum* se observam duas bandas com pesos moleculares relativamente próximos: uma banda ténue

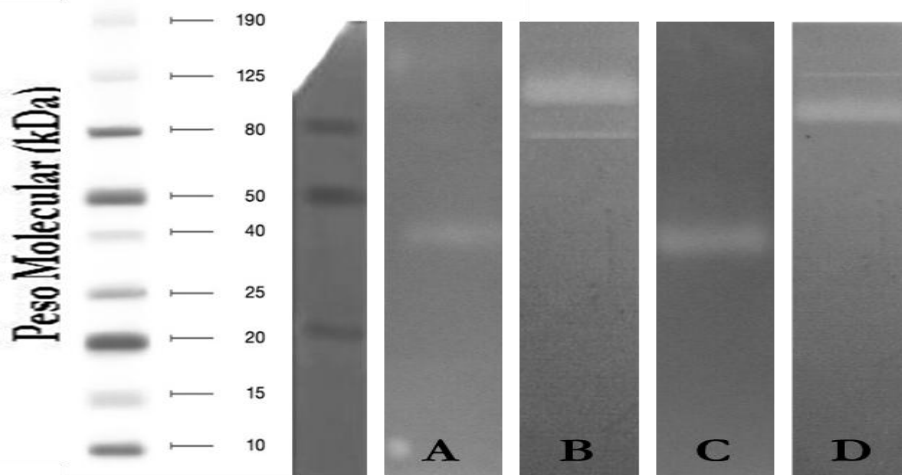


Figura 15: Perfil zimográfico dos extractos utilizados neste trabalho. A preceder a imagem A encontra-se a representação do marcador de peso molecular (HyperPAGE Prestained Protein Marker, Bioline, Reino Unido). Cada imagem demonstra a actividade lítica provocada pelos extractos num gel desnaturalante com 12 % acrilamida e 2 mg/mL de substrato. Imagem 15A – 10 µg de extracto total de *T. b. brucei* sobre gelatina; imagem 15B – 2 µg de extracto total de *L. infantum* sobre gelatina; imagem 15C – 10 µg de extracto total de *T. b. brucei* sobre caseína; imagem 15D – 2 µg de extracto total de *L. infantum* sobre caseína. Todos os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue*.

com peso molecular entre 50 e 80 kDa, e uma banda intensa com peso molecular entre 80 e 125 kDa. No caso específico da actividade gelatinolítica do extracto de *T. b. brucei* (figura 15A), os resultados estão de acordo com estudos anteriores (De Sousa *et al.*, 2010), onde foi mostrado que uma gelatinase de baixo peso molecular, com actividade gelatinolítica numa gama restrita de pH e temperatura, está presente em extractos deste parasita. Os resultados obtidos também permitem sugerir que esta MMP poderá ser expressa de forma estável durante a fase sanguínea da infecção, uma vez que todos os ensaios zimográficos realizados com extractos deste parasita demonstraram actividade gelatinolítica nesta gama de peso molecular. De acordo com a literatura, uma vez estabelecida no hospedeiro, a forma sanguínea do *Trypanosoma* é heterogénea (Baral *et al.*, 2010), contendo tanto as formas proliferativas tripomastigotas durante a fase crescente de parasitémia, como as formas não-proliferativas durante o pico de parasitémia (Matthews *et al.*, 2004). Assim, é possível supôr que ambas as formas do parasita expressam a matrixina aqui detectada, apesar de estudos mais específicos serem necessários para obter conclusões factuais. Da mesma forma, o facto citado na literatura vem adicionar crédito à possibilidade da matrixina aqui detectada ser provavelmente uma gelatinase, pois é sabido que a gelatinase A de *Trypanosoma brucei* é expressa estavelmente na forma sanguínea do parasita (LaCount *et al.*, 2003). Porém, não é possível excluir inteiramente a possibilidade de cumulativamente existirem outras MMP no extracto, com actividade inespecífica sobre a gelatina, dado que as matrixinas são especialmente promíscuas no que respeita aos seus substratos (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Ryan e Ashley, 1998). Uma forma de contornar esta dúvida seria a sequenciação dos enzimas presentes nas bandas de actividade proteolítica, a fim de confrontar as sequências assim obtidas com as sequências já referenciadas nos bancos de dados.

Ainda em relação à actividade gelatinolítica do extracto de *T. b. brucei*, é referida na literatura a observação de duas bandas de actividade, com uma diferença de aproximadamente 10 kDa (Parks, 1999); no caso do *T. b. brucei*, não foi possível detectar a segunda banda de actividade, possivelmente correspondente à pró-forma do enzima. Tal facto poderá dever-se a uma predominância da forma activa do enzima no extracto utilizado nestes ensaios. A única banda de actividade gelatinolítica aqui observada tem um peso molecular aproximado de 40 kDa, suportando resultados anteriormente obtidos por De Sousa *et al.* (2010) e Gonçalves (2011).

Quanto aos resultados da actividade sobre a gelatina do extracto de *L. infantum* (figura 15B, página 46), é possível observar-se duas bandas de actividade proteolítica, como

referido: uma banda ténue com peso molecular entre 50 e 80 kDa, e uma banda intensa com peso molecular entre 80 e 125 kDa. Estes resultados estão de acordo com outros já publicados, nomeadamente para *L. chagasi* e *L. braziliensis* (Costa *et al.*, 2008; Cuervo *et al.*, 2008).

No caso dos resultados obtidos em relação à actividade caseinolítica destes extractos de parasitas (figura 15C e 15D, página 46), resultados interessantes surgiram por comparação com os resultados sobre gelatina. Efectivamente, a proteólise observada para o extracto de *T. b. brucei* não se altera, surgindo uma banda caseinolítica com o mesmo peso molecular que a banda gelatinolítica: aproximadamente 40 kDa; no caso do extracto de *L. infantum*, o resultado é ainda mais interessante, visto que há uma inversão da intensidade das bandas de actividade, com uma banda mais ténue à altura de 80 a 120 kDa, e uma banda intensa com peso molecular de aproximadamente 80 kDa. Esta segunda banda de actividade poderá corresponder à degradação da banda de maior peso molecular e geração de um produto de menor tamanho, tal como foi sugerido por Ramu *et al.* (2007); isto é corroborado pelo facto de a banda de menor peso molecular demonstrar quantitativamente uma actividade muito mais intensa, possivelmente correspondendo a uma maior concentração dessa forma clivada em relação à pró-forma, de maior peso molecular. No entanto, é discutível se a banda mais ténue é de facto uma pró-forma do enzima, parecendo antes uma indicação clara sobre a inespecificidade das matrixinas em relação aos seus substratos. Esta hipótese é reforçada pelo resultado da proteólise, aparentemente pelo mesmo enzima, da gelatina e da caseína a partir do extracto de *T. b. brucei*. Apesar de gelatinases e caseinases estarem colocadas em grupos diferentes na classificação das metaloproteinases de matriz, é sabido que esta classificação se baseia principalmente nas propriedades arquitecturais da molécula, tendo em conta os domínios e subdomínios presentes, mais do que nas suas actividades biológicas (Kessenbrok *et al.*, 2010). Assim, não é de admirar que existam muitas sobreposições quanto aos substratos das diferentes metalopeptidases (como revisto na tabela 1 da Introdução), neste caso evidenciadas pelos resultados obtidos quanto às capacidades gelatino- e caseinolíticas das MMP presentes nos extractos estudados. Outra hipótese a ter em conta, talvez a mais óbvia, é a possibilidade de as duas bandas de actividade representarem duas diferentes metaloproteinases.

Em relação aos ensaios zimográficos de inibição (gráficos 1 e 2, páginas 49 e 51 respectivamente), foram obtidos múltiplos resultados que vão de encontro aos objectivos propostos para este trabalho experimental. Por um lado, os resultados alcançados permitem

avaliar o impacto da intervenção com inibidores de proteases na actividade zimográfica das metaloproteínas dos diferentes extractos; por outro, os mesmos resultados facultam a compreensão crítica das propriedades das metaloproteínas, facilitando a especulação de possíveis alvos quimioterapêuticos contra os parasitas estudados.

Para a inibição da actividade gelatinolítica das metaloproteínas dos dois parasitas em estudo, os resultados parecem sugerir (gráfico 1) que os inibidores utilizados neste estudo possuem de facto a capacidade de inibir a actividade das matrixinas dos dois parasitas estudados, e mais, que a sua capacidade inibitória varia entre essas espécies. A variação da concentração mínima necessária para inibir 100 % da actividade proteolítica dos extractos sugere que também esta resistência é intrínseca a cada parasita e à sua evolução enquanto espécie, reflectindo os diferentes tropismos parasitários e muito provavelmente o proteoma diferencial de cada um, apesar do alto grau de conservação do genoma entre as espécies tripanosomatídeas.

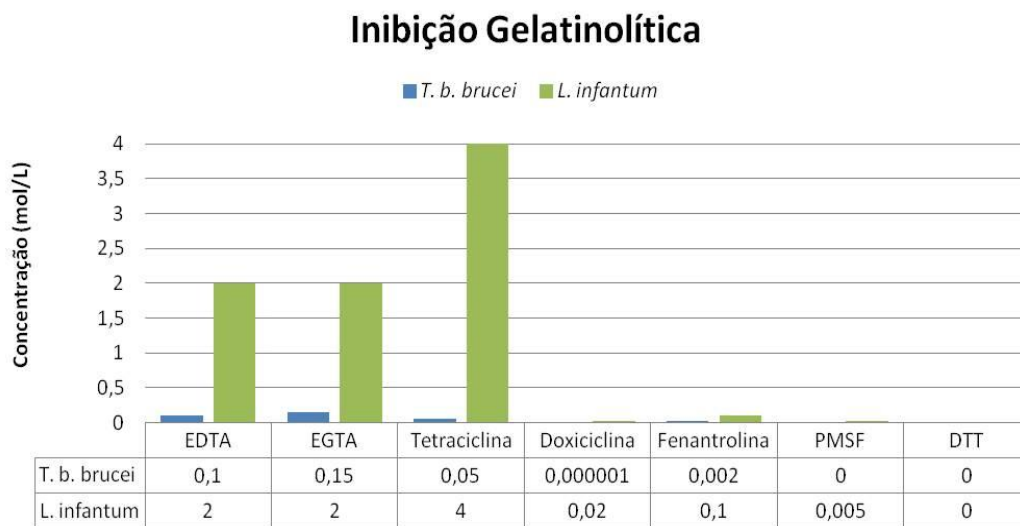


Gráfico 1: Concentração mínima, em mol/L, necessária para obter 100% de inibição da actividade gelatinolítica de metaloproteínas presentes nos extractos em estudo. A indicação de zero mol/L indica que não foi possível inibir a actividade do extracto com esse inibidor.

Não é surpresa que EDTA e EGTA tenham inibido as actividades evidenciadas pelos resultados de zimografia anteriormente discutidos, pois estas moléculas são quelantes de cálcio, um cofactor necessário para a actividade das gelatinases (De Sousa *et al.*, 2010). Do mesmo modo, para a inibição do zinco catalítico (através da acção da fenantrolina), os resultados mostram que uma quantidade muito pequena deste composto é capaz de inibir totalmente a acção das metaloproteínas aqui em estudo. Este resultado é facilmente

explicado pelas próprias características bioquímicas das MMP, no sentido em que o seu potencial catalítico depende não apenas do átomo de zinco catalítico obrigatório, como do segundo átomo de zinco estrutural (Borkakoti *et al.*, 1998).

Foi necessária uma concentração de apenas 2 mM de fenantrolina, contra 100 mM de EDTA ou EGTA, para obter 100 % de inibição gelatinolítica no caso de *T. b. brucei*, ou 100 mM de fenantrolina contra 2 M de EDTA ou EGTA no caso de *L. infantum*. Estes resultados também sugerem a inexistência de uma relação linear entre a concentração de inibidor e a sua capacidade em bloquear a actividade proteolítica de cada extracto, sendo provavelmente esta capacidade função do mecanismo de acção do próprio inibidor e da singularidade do sítio activo de cada MMP em particular.

Quanto aos antibióticos, tetraciclina e doxiciclina, além de serem também agentes quelantes, são moléculas ionóforas, capazes de interferir com os ribossomas, e ainda produtoras de radicais livres (Sapadin *et al.*, 2006). No caso particular das tetraciclinas (da qual a doxiciclina é um derivado), já foram postulados múltiplos mecanismos pelos quais são capazes de inibir a cascata de degradação matricial mediada pelas MMP (Nwagwu *et al.*, 1988; Guiliano *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2004).

Para os resultados com PMSF, não se verifica inibição da actividade proteolítica para os extractos de *Trypanosoma*, mas pelo contrário, 5 mM deste composto foram suficientes para inibir 100 % da actividade do extracto de *Leishmania infantum*. Este resultado está de acordo com a literatura em relação a *T. b. brucei*, pois metaloproteinases não são inibidas por PMSF (Bellosta *et al.*, 2007); no entanto, os resultados correspondentes ao extracto de *L. infantum* parecem indicar que este reagente tem acção sobre outras proteases contidas no extracto total, mas não sobre as metaloproteinases específicas neste extracto. A inibição de metaloproteinases por PMSF já foi descrita anteriormente (Sun *et al.*, 2007), no entanto parece mais provável que a inibição aqui verificada seja a de uma serinoprotease, da qual o PMSF é um inibidor selectivo (Bellosta *et al.*, 2007).

No caso da inibição caseinolítica (gráfico 2, página 51), os resultados não parecem diferir significativamente dos obtidos para a inibição da actividade gelatinolítica, pelo menos no caso de *T. b. brucei*. De facto, as concentrações necessárias para inibir a actividade do(s) enzima(s) responsáveis pela degradação do substrato são idênticas para gelatina ou caseína.

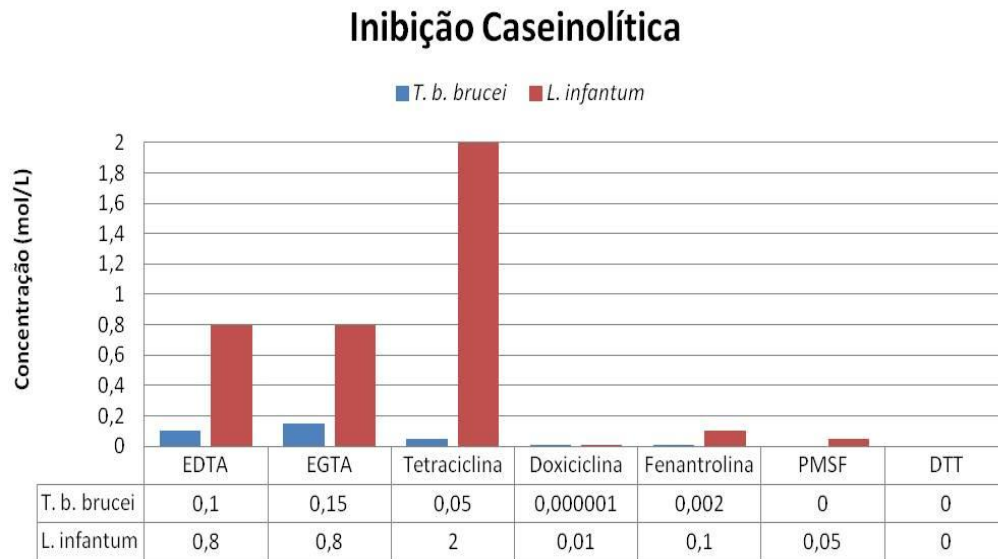


Gráfico 2: Concentração mínima, em mol/L, necessária para obter 100% de inibição da actividade caseinolítica de metaloproteinases presentes nos extractos em estudo. A indicação de zero mol/L indica que não foi possível inibir a actividade do extracto com esse inibidor.

Dessa forma, há uma possibilidade de inferência para que seja o mesmo enzima o responsável pelo resultado observável; esta hipótese é reforçada pelo obtido na figura 15 (página 46), onde se verifica que a actividade lítica se desenvolve à mesma altura no gel em comparação com os marcadores de peso molecular, isto é, a actividade observável é devida a um enzima com o mesmo peso molecular tanto no caso da gelatina como no caso da caseína. Esta hipótese também reforça o resultado anterior, referido na discussão do resultado do extracto de *T. b. brucei* sobre gelatina e caseína.

O conjunto dos resultados sobre a inibição das matrixinas dos dois parasitas estudados permite sugerir alguns possíveis compostos com interesse quimioterapêutico, nomeadamente a utilização de Doxíciclina e Fenantrolina para a inibição das matrixinas tanto de *T. b. brucei* como de *L. infantum*, e o uso de Tetraciclina para a inibição das matrixinas de *T. b. brucei*, visto que doses reduzidas destes compostos interferem respectivamente com o mRNA, com a disponibilidade de iões de Zn^{2+} , e com a disponibilidade de espécies reactivas de oxigénio (tabela 2, página 38), interferindo desse modo com a actividade global das metaloproteinases e podendo possivelmente diminuir a capacidade de infecção ou progressão dos parasitas na corrente sanguínea do hospedeiro,

onde se sabe que as matrixinas têm um papel fundamental, tal como revisto na Introdução deste trabalho.

Um resultado digno de nota, que veio ao encontro dos dados obtidos a partir da literatura citada sob o ponto 1.4.2.3 da Introdução desta dissertação, foi obtido de forma incidental e derivou de um equívoco numa prática laboratorial comum. Na preparação dos géis de SDS-PAGE é usual adicionar-se um pequeno volume de butanol ou isopropanol para aperfeiçoar a interface entre o gel de resolução e o gel de empacotamento e retirar o oxigénio da superfície do gel de resolução (Hames, 2002), ou mesmo para solubilizar amostras que são insolúveis em água (Mutluay *et al.*, 2011). Aquando da preparação dos géis de zimografia (directamente derivados dos géis de SDS-PAGE), imediatamente antes da sobreposição do gel de empacotamento sobre o gel de resolução, retira-se completamente o álcool com a ajuda de um papel de filtro. Uma quantidade ínfima de butanol, não retirada da preparação por lapso, parece ter influenciado o resultado final do zimograma, tendo sido observada uma inibição quase total da actividade gelatinolítica proveniente de *T. b. brucei* aquando da sua interacção com vestígios do álcool presentes nos géis (resultados não apresentados). Essa inibição desaparece quando o solvente não é utilizado na preparação. Ainda que este álcool seja capaz de evaporar-se rapidamente e portanto a probabilidade de contaminação seja baixa, uma secagem menos meticulosa ou a montagem excessivamente rápida do gel de empacotamento poderão ter levado a que o álcool tenha ficado aprisionado no gel sem que tenha havido evaporação ou diluição a partir das moléculas de água presentes na malha do gel de acrilamida (Mutluay *et al.*, 2011). Com este resultado, é possível sugerir que as metaloproteinases presentes no extracto total parecem ser inibidas muito fortemente por butanol. Ainda, será interessante notar que a inactivação das metaloproteinases pelo butanol poderá ter ocorrido de forma irreversível, pois nem o processo electroforético de separação, nem as lavagens contidas no método, nem o passo de renaturação dos enzimas com Triton-X 100 permitiram a reconformação da matrixina na sua forma activa, tendo a inibição sido de 100 % no resultado final.

As características biológicas e génicas que influenciam a capacidade proteolítica dos diferentes parasitas, referidas anteriormente, poderão ser clarificadas (ou pelo menos insinuadas) pela análise bioinformática das sequências das MMP dos diferentes parasitas em estudo. Apesar de terem divergido há 200 a 500 milhões de anos, pré-datando a emergência dos mamíferos (Douzery *et al.*, 2004), os genomas das espécies tripanosomatídeas exibem elevada sintenia. Uma comparação entre o conteúdo e a arquitectura génica de *T. brucei*,

T. cruzi, e *L. major* revelou um proteoma de aproximadamente 6200 genes conservados que são agregados de genes policistrônicos sinténicos (El-Sayed *et al.*, 2005). Interessantemente, apesar de os principais factores de virulência serem diferentes entre cada tripanosomatídeo descrito neste trabalho experimental (*T. brucei* – VSGs, Glicoproteínas variantes de superfície; *T. cruzi* – TSA, trans-sialidase; *Leishmania* sp. – GP63), existe entre os factores de virulência reconhecidamente envolvidos na interacção parasita/hospedeiro uma metaloprotease comum entre os três tripanosomatídeos em estudo, a protease GP63 (Santos *et al.*, 2006; Yao 2010; Ma *et al.*, 2011).

É importante ressaltar o facto de que o trabalho bioinformático aqui realizado se deparou com uma dificuldade óbvia no passo inicial de prospecção das sequências génicas a serem estudadas: o genoma de *L. infantum*, tendo sido sequenciado em 2003 (para o clone JPCM5) (Peacock *et al.*, 2007), não se encontra ainda totalmente anotado; tendo sido esta a espécie utilizada nos procedimentos experimentais desta dissertação, foi mantido em mente o facto de o genoma das espécies de *Leishmania* ser altamente conservado (El-Sayed *et al.*, 2005a; Santos *et al.*, 2006; Yao 2010; Ma *et al.*, 2011).

As sequências utilizadas (tabela 3, página 39; e anexo 1) foram alinhadas de acordo com o descrito anteriormente, sendo os resultados obtidos concordantes com a literatura actual sobre o tema. O alinhamento sumarizado na figura 16, aprofundado com o alinhamento múltiplo da figura 17 (página seguinte), mostrou também que o alinhamento

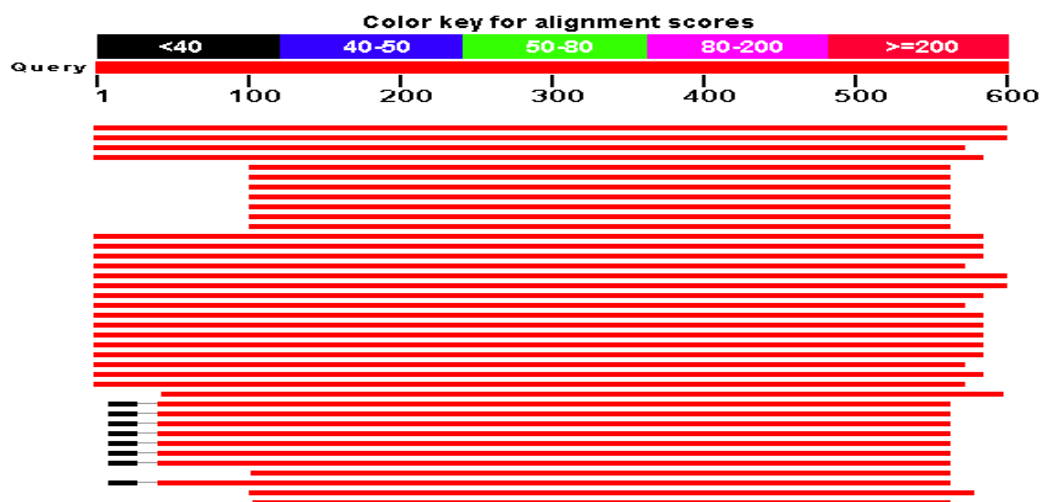


Figura 16 – Sumário gráfico do alinhamento de 40 sequências anotadas como “GP63” para 4 espécies de interesse: *T. b. brucei*, *L. major*, *L. infantum*, *T. cruzi*.



Figura 17 – Excerto do alinhamento múltiplo das 40 sequências prospectadas. Este alinhamento foi efectuado no *software* ClustalW utilizando 40 sequências proteicas anotadas de 4 espécies: *T. Brucei*, *T. cruzi*, *L. major*, *L. infantum*. Aqui é mostrado o alinhamento múltiplo entre os resíduos 295 e 424, uma zona com elevado grau de conservação entre as espécies.

mais significativo ocorre a partir do resíduo na posição 278 da sequência de referência, gi_157865343, *Leishmania major* – estirpe *Friedlin*. Antes dessa posição, todas as espécies e sequências estudadas à exceção de *T. cruzi* contém uma região com aproximadamente 80 aminoácidos, rica em resíduos hidrofílicos, antecedida por uma zona relativamente rica em resíduos de cisteína na porção inicial da sequência. Esta zona poderá corresponder ao pró-peptídeo que é clivado durante a activação da metaloproteinase, zimogénica, que está referenciado como sendo constituído por cerca de 80 aminoácidos (Bode *et al.*, 1999; Kessenbrok *et al.*, 2010; Geurts *et al.*, 2012), pelo menos no caso das matrixinas humanas.

Interessantemente, esta região não parece existir para as sequências de *T. cruzi* aqui prospectadas. No entanto, a análise torna-se ainda mais peculiar com a observação do facto de três das dez sequências de *T. cruzi* (30 %) parecerem depletadas de um número ainda maior de resíduos. Os aminoácidos em falta nessas três sequências precedem a substituição do padrão PTVVRAAN nas outras espécies (nos quais é conservado) pelo padrão ASGDGDDG conservado para as 3 espécies aberrantes de *T. cruzi* (respectivamente as sequências identificadas com os números 37, 39 e 40 na tabela 3, apresentada na página 39). Esta modificação é curiosa do ponto de vista bioquímico porquanto representa uma alteração de um padrão mais hidrofóbico e apolar para um padrão mais polarizado e hidrofílico, com a perda de um resíduo de prolina, provavelmente com carácter estrutural, e o ganho de uma zona carregada negativamente. É esperado que esta diferença se venha a reflectir na árvore filogenética como um acontecimento de especiação ou de selecção positiva para as três sequências de *T. cruzi* aqui destacadas como aberrantes.

Imediatamente a seguir a esta alteração de padrão, observa-se uma nova zona altamente conservada (*score* superior a 200), com predominância em resíduos polares e portanto com interações favoráveis com o solvente, provavelmente à superfície da proteína e correspondendo possivelmente ao domínio catalítico. Esta zona estende-se aproximadamente entre os resíduos 295 a 424, como verificado no alinhamento ilustrado na figura 17. Este elevado grau de conservação é corroborado pela figura 18 (página 56), que corresponde à estrutura referenciada da leishmanolisina (PDB ID#1lml, código DOI:10.2210/pdb1lml/pdb) e que permite transpôr o raciocínio aplicado às sequências lineares para a estrutura tridimensional da proteína. As regiões marcadas a verde na figura 18, isto é, as zonas contendo os resíduos conservados nas posições 295 e 424, parecem pertencer ao bolso catalítico da estrutura enzimática. Uma vez que foi verificado no alinhamento da figura 17 que estas zonas estão flanqueadas por regiões com carácter mais

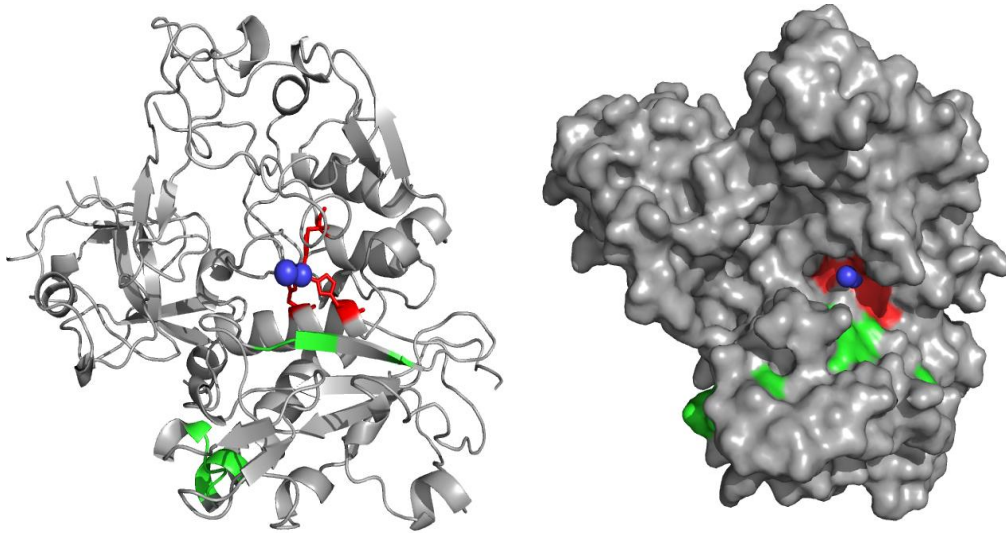


Figura 18 – Estrutura e superfície topográficas da leishmanolisina. A azul estão indicados dois iões de zinco co-factores, a vermelho estão indicados os resíduos de histidina na zona catalítica e a verde estão ilustradas as zonas de maior conservação, na proximidade dos resíduos 295 e 424. Estas estruturas estão referenciadas no PDB com o código DOI:10.2210/pdb1lml/pdb.

variável (existindo em alguns casos aminoácidos com carga positiva e negativa a ocupar a mesma posição em sequências diferentes), é possível especular que esta variabilidade em torno da região catalítica contribua para a promiscuidade das matrixinas em relação aos seus substratos.

O alinhamento da figura 17, bem como a estimativa da divergência evolucionária (anexo 3), confirmam o elevado grau de conservação da sequência da matrixina GP63 entre as espécies de tripanosomatídeos estudadas. Esta informação encontra-se resumida na tabela 5 sob a forma de percentagens de identidade e similaridade entre as sequências.

Tabela 5: Percentagens de identidade (diagonal inferior) e similaridade (diagonal superior) entre as sequências da matrixina GP63 nos diferentes parasitas em estudo bioinformático.

	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>T. b. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>
<i>L. major</i>	s/s	85 %	38 %	35 %
<i>L. infantum</i>	90 %	s/s	37 %	35 %
<i>T. b. brucei</i>	47 %	47 %	s/s	52 %
<i>T. cruzi</i>	49 %	48 %	60 %	s/s

Nota: As sequências utilizadas para esta comparação são respectivamente as sequências número 1, 21, 8 e 31 identificadas na tabela 3. Esta tabela foi efectuada com recurso ao alinhamento *pairwise* entre cada duas sequências, com recurso ao algoritmo de Needleman-Wunsch.

Em relação aos resultados sumarizados na tabela 5, é necessário salientar a importância do confronto entre as percentagens de identidade e similaridade entre as sequências em estudo. De facto, tomando em consideração apenas os resultados obtidos com a percentagem de identidade, correr-se-ia o risco de perder ou negligenciar informação sobre mutações sinónimas, silenciosas ou mutações que, alterando o aminoácido presente na cadeia linear, possuam ainda assim o mesmo tipo de propriedades físico-químicas (por exemplo, a alteração de um resíduo de ácido aspártico para um resíduo de ácido glutâmico); a avaliação da similaridade permite, por sua vez, obter uma indicação sobre o grau de homologia das sequências em estudo.

Os resultados obtidos com este confronto parecem indicar mais uma vez o elevado nível de conservação desta proteína, mesmo com a observação de alguns resultados particulares dos alinhamentos *pairwise*, representados na tabela 5, que não parecem à partida confirmar o elevado grau de conservação reportado na literatura. No entanto, é necessário ter em conta dois factores:

(1) as MMP dos tripanosomatídeos são codificadas por múltiplos genes que podem variar na sua sequência, especialmente em regiões não-traduzidas (Yao *et al.*, 2010). Os genes de *Leishmania* spp. estudados até à data, por exemplo, encontram-se usualmente dispostos em conjuntos e são frequentemente expressos de forma diferenciada durante os vários estágios do seu ciclo de vida (Roberts *et al.*, 1995). Esta heterogeneidade dos genes para MMP, que não afecta os domínios enzimáticos, torna possível a regulação estágio-específica das matrixinas (Yao *et al.*, 2010).

(2): não foi seleccionada uma região especificamente conservada da sequência aminoacídica da protease GP63 para a análise aqui descrita, por exemplo a sequência dos seus domínios catalíticos; este facto acrescenta variabilidade e implica uma diminuição lógica dos *scores* dos alinhamentos. Esta variância também foi propositadamente maximizada com a inclusão de diferentes estirpes dos parasitas, como pôde ser observado na tabela 3.

Ainda assim, verificam-se tal como esperado, maior nível de semelhança entre sequências do mesmo género (acima de 80% dentro do género *Leishmania*, e acima de 50% para o género *Trypanosoma*). A percentagem média de aproximadamente 36 % encontrada no confronto entre as sequências do género *T. brucei* e *L. infantum* estão de acordo com resultados reportados previamente por Grandgenett *et al.* (2007).

Utilizando o *software* disponível online (CDD-NCBI), foi feita uma pesquisa contra domínios conservados a fim de se garantir a relevância das sequências utilizadas. O resultado desta pesquisa (figura 19) mostra que todas as sequências utilizadas contêm um domínio correspondente à superfamília da metalopeptidase M8, isto é, a leishmanolisina (de acordo com a base de dados MEROPS, disponível em <http://merops.sanger.ac.uk>).

Query	Hit type	PSSM-ID	From	To	E-Value	Bitscore	Accession	Short name	Incomplete	Superfamily
Q#1 - 157865343	specific	201806	46	568	0	887.599	pfam01457	Peptidase_M8	-	cl03222
	superfamily	207882	46	568	0	887.599	cl03222	Peptidase_M8 superfamily	-	-
Q#2 - 72392395	superfamily	207882	69	553	7.98904e-157	458.101	cl03222	Peptidase_M8 superfamily	-	-
	multi-dom	185529	47	586	1.33253e-98	311.636	PTZ00257	PTZ00257	-	-
Q#3 - 321399012	specific	201806	46	565	0	896.844	pfam01457	Peptidase_M8	-	cl03222
	superfamily	207882	46	565	0	896.844	cl03222	Peptidase_M8 superfamily	-	-
	multi-dom	185529	1	567	0	730.733	PTZ00257	PTZ00257	-	-
Q#4 - 71649206	superfamily	207882	23	508	0	520.998	cl03222	Peptidase_M8 superfamily	-	-
	multi-dom	185529	24	541	7.73081e-110	339.371	PTZ00257	PTZ00257	-	-

Figura 19. Resultado textual da pesquisa de domínios conservados nas sequências estudadas, revelando a presença do domínio correspondente à superfamília de metalopeptidases M8. As *queries* 1 a 4 correspondem respectivamente a sequências de *L. major*, *T. b. brucei*, *L. infantum* e *T. cruzi*, as sequências número 1, 8, 21 e 31 identificadas na tabela 3.

Pela análise conjunta das tabelas 3 e 5 e das figuras 16 e 17, é esperado que a árvore filogenética apresente algumas exceções aberrantes no seu resultado, nomeadamente para as sequências 5, 13 e 14 correspondentes a sequências de *T. b. brucei*; de facto, não apenas o número de aminoácidos da sua sequência linear é diferente dos seus pares, como logicamente o é, da mesma forma, a massa molecular calculada – e mais importante, o alinhamento com as múltiplas outras sequências parece aproximá-las mais do género *Leishmania* do que do género *Trypanosoma*. Realmente, este resultado surge claramente na árvore filogenética (figura 20, próxima página) resultante do alinhamento entre as sequências prospectadas, onde estão indicadas com um asterisco. Estas aberrações podem ser resultado de mutações ou acontecimentos de selecção positiva que tenham influenciado o proteoma do parasita.

Na sua globalidade, porém, os resultados obtidos com esta árvore filogenética (figura 20) vêm ao encontro da informação obtida por Douzery *et al.* (2004) e El-Sayed *et al.* (2005); de facto, os resultados alcançados sugerem que apesar de a divergência dos parasitas ter ocorrido precocemente no tempo, tal como evidenciado pela separação dos géneros *Leishmania* e *Trypanosoma* na árvore filogenética, existe uma elevada consistência na

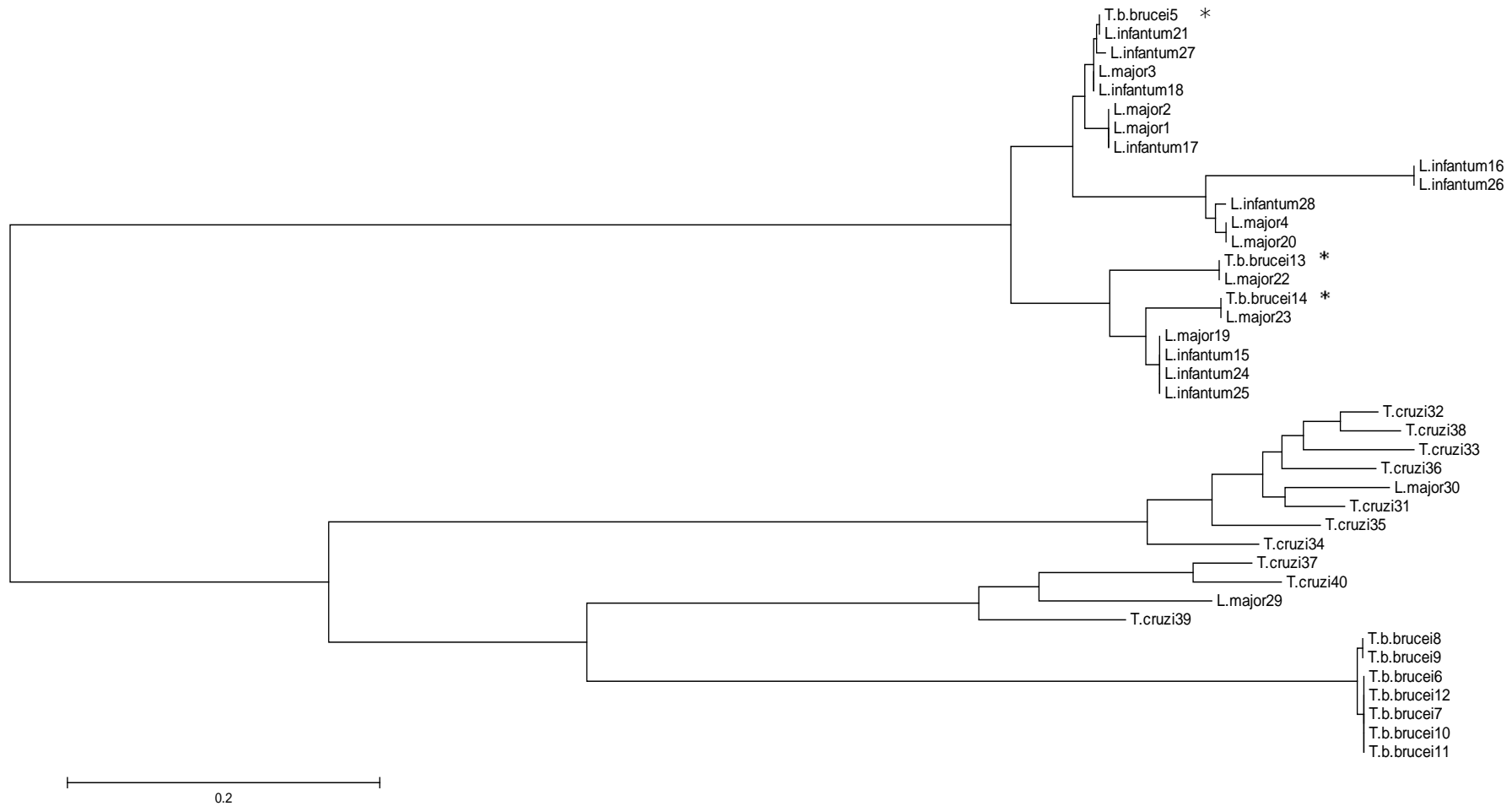


Figura 20 – Análise filogenética molecular pelo método de *Maximum Likelihood*. A história evolutiva foi inferida pelo método de *Maximum Likelihood* baseado no modelo de matriz Jones-Taylor-Thornton. A árvore de consenso *bootstrap* foi inferida a partir de 100 réplicas e representa a história evolutiva das espécies analisadas. A árvore está desenhada à escala, com o comprimento de cada ramo medido em número de substituições por local, sendo envolvidas 40 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo *gaps* foram eliminadas. A análise evolutiva foi efectuada no *software* MEGA, versão 5. Os números associados ao nome das sequências referem-se ao número de entrada na tabela 3 deste trabalho.

sequência da metaloproteinase GP63, assim como é provável que essa especiação tenha ocorrido por sucessivas selecções positivas ao longo da sua história evolutiva. Este facto fica evidente quando se analisa a matriz de divergência evolucionária (anexo 3) à luz da árvore filogenética (figura 20, página anterior), sendo possível dessa forma sugerir que as alterações ocorridas no genoma sejam mutações sinónimas, conferindo por um lado plasticidade e variabilidade ao enzima, e por outro, a sua conservação estrutural e bioquímica. Assim, é possível que as alterações na estrutura molecular da matrixina GP63 nos tripanosomatídeos estudados tenham surgido para acompanhar a exigência da alteração das funções das proteases no decurso da evolução destes organismos, tendo derivado de um ancestral comum e sido mantida por selecção positiva ao longo do tempo. No entanto, importa realçar que a equivalência topológica na estrutura terciária destas proteínas (Borkakoti *et al.*, 1998) contrasta com as diferenças na sua estrutura primária, como evidenciado pelos alinhamentos e discussão anteriores. Esta observação enfatiza o facto de longas distâncias evolucionárias conservarem mais fielmente a estrutura do que a sequência de uma proteína, e sugere ainda que os domínios catalíticos das MMP terão evoluído a partir de um ancestral comum.

Ainda, é possível uma extrapolação em relação à bioquímica e fisiologia dos quatro parasitas estudados por via bioinformática: a análise da percentagem de identidade parece sugerir que as MMP dos parasitas com uma fase intracelular do seu ciclo de vida (*T. cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum*) contêm maiores similaridades na topologia da sua GP63 quando comparada com o parasita exclusivamente extracelular (*T. brucei*).

Finalmente, a análise integrativa dos resultados obtidos pelas práticas bioinformáticas indicam que os genomas das espécies em estudo mantêm um elevado grau de conservação no que refere à estrutura da matrixina GP63, o que sugere um papel pivotal desta proteinase no ciclo de vida e na biologia destes organismos. Sendo parasitas, poderá especular-se também sobre a importância fulcral desta proteína nos processos de infecção do hospedeiro mamífero.

Contextualizando a globalidade dos resultados para a prática clínica, este trabalho cumpre plenamente os objectivos propostos, mostrando que a inibição das matrixinas parasitárias é possível com concentrações moderadas de diversos fármacos, sendo possível utilizar compostos considerados relativamente comuns (tetraciclina, doxiciclina) para possivelmente conseguir diminuir a infectividade relacionada com a acção das MMP. Esta acção já foi mostrada *in vivo*, onde murganhos tratados com minociclina *per os* parecem

demonstrar um menor nível de actividade proteolítica em zimogramas de actividade gelatinolítica (Gonçalves, 2011).

No entanto, e em concordância com tópicos abordados durante a Introdução deste trabalho, é necessário recordar o efeito naturalmente “Jekyll e Hyde” (segundo a observação de Morrison *et al.*, 2009) das MMP, mantendo em mente que nem todas as matrixinas possuem efeitos prejudiciais, e que cada potencial protocolo de tratamento deve ser avaliado com prudência, uma vez que, acima de tudo, as MMP colaboram colectivamente para a criação de cascatas de activação e redes de transformação da ECM; de facto, a simplicidade em pensar sobre as MMP exclusivamente como enzimas capazes de degradar a matriz extracelular foi e continuará a ser erodida pelo reconhecimento de numerosos e importantes papéis destas proteínas extremamente flexíveis.

5. Conclusões

Tal como as muitas proteínas por elas modificadas, as metaloproteinases influenciam diversas reacções fisiopatológicas. A caracterização estrutural e funcional mais detalhada das metaloproteinases tem permitido pensar em termos inovadores em relação ao funcionamento destas máquinas catalíticas, o que em conjunto com o estudo da biologia dos parasitas poderá conduzir a desenvolvimentos práticos importantes tal como novas estratégias de quimioterápica e vacinas. Adicionalmente, o aperfeiçoamento de inibidores selectivos de metaloproteinases-chave poderá ser uma ajuda inestimável ao combate às patologias relacionadas com a degradação da matriz extracelular, que continuam a infligir uma tremenda carga social e económica sobre as sociedades humanas, particularmente nas regiões tropicais e sub-tropicais do Mundo, onde têm tido como tal um efeito profundo sobre o curso da História da Humanidade e da Evolução.

Neste trabalho, as metaloproteinases de dois diferentes extractos parasitários foram prospectados em relação ao seu conteúdo em matrixinas. Em ambos, a expressão destas proteínas foi identificada, analisada e comparada. Foi verificado para o extracto de *T. b. brucei* actividade gelatinolítica e caseinolítica sob a forma de uma banda de actividade lítica única, que pode ser visualizada a partir de 10 µg de proteína total e que corresponde a uma metaloproteinase com peso molecular aproximado de 40 kDa. Para o extracto de *L. infantum*, a actividade lítica é visualizada a partir de 2 µg de proteína total, sendo variável entre os dois substratos abordados, gelatina e caseína. Para gelatina, observam-se duas bandas de actividade proteolítica: uma banda ténue com peso molecular entre 50 e 80 kDa, e uma banda intensa com peso molecular entre 80 e 125 kDa. Quanto à actividade caseinolítica, parece haver uma inversão da intensidade das bandas de actividade, com uma banda mais ténue à altura de 80 a 120 kDa, e uma banda intensa com peso molecular de aproximadamente 80 kDa. Os resultados obtidos permitem supor que a expressão de metaloproteinases activas é estável no ciclo de vida destes parasitas, sendo tal facto sugestivo da sua importância na progressão das patologias provocadas pelos diferentes agentes em estudo.

Foi também mostrado que a inibição das matrixinas parasitárias é possível com concentrações moderadas de diversos fármacos; no caso da utilização de agentes quelantes (EDTA, EGTA) foi obtida 100 % de inibição com doses na ordem dos milimolares para *T. b. brucei*. A utilização de antibióticos relativamente comuns (tetraciclina, doxiciclina) para

o mesmo parasita mostrou ser extremamente eficaz na redução da actividade proteolítica das metaloproteinases, conseguindo-se completa inibição com apenas 1 μ M de doxiciclina. Em relação a *L. infantum*, por comparação com *T. b. brucei*, foi necessário em todos os casos aumentar a concentração de agente inibidor para conseguir a inibição completa das matrixinas, sendo necessárias concentrações sempre superiores a 0,8 M no caso dos agentes quelantes e superiores a 2 M no caso da tetraciclina. Os fármacos com maior capacidade de inibição das matrixinas de *L. infantum* foram a doxiciclina e o PMSF, com dosagem inibitória na ordem dos milimolares.

Dessa forma, é possível sugerir que a utilização de Doxiciclina e Fenantrolina para a inibição das matrixinas tanto de *T. b. brucei* como de *L. infantum*, e o uso de Tetraciclina para a inibição das matrixinas de *T. b. brucei* possuem interesse quimioterapêutico, visto que interferem com a actividade global das metaloproteinases e poderão possivelmente diminuir a capacidade de infecção ou progressão dos parasitas na corrente sanguínea do hospedeiro.

A variação da concentração mínima necessária para inibir 100 % da actividade proteolítica dos extractos sugere que também esta resistência é intrínseca a cada parasita e à sua evolução enquanto espécie, reflectindo os diferentes tropismos parasitários e muito provavelmente o proteoma diferencial de cada um.

Estes resultados são corroborados pela análise bioinformática, que sugere uma conservação estrutural e bioquímica da metaloproteinase GP63, comum aos tripanosomatídeos estudados, apesar da aparente existência de mutações sinónimas. Estas mesmas mutações poderão ter aumentado a plasticidade e variabilidade do enzima, conferindo-lhe a capacidade de processar um maior número de substratos e por isso sendo mantidas como resultado de acontecimentos de selecção positiva ao longo do tempo.

Finalmente, de forma sucinta, os resultados obtidos através dos métodos e condições descritas parecem indicar que:

- 1) a caracterização zimográfica das metaloproteinases de *T. b. brucei* a partir de extractos de proteína total é conseguida para massas de proteína superiores a 10 μ g e a actividade gelatino- e caseinolítica visualmente observável parece ser devida a uma protease com peso molecular aproximado de 40 kDa;
- 2) a caracterização zimográfica das metaloproteinases de *L. infantum* a partir de extractos de proteína total é conseguida para massas de proteína superiores a 2 μ g e a actividade gelatino- e caseinolítica visualmente observável é variável entre os dois substratos estudados. Para gelatina, observam-se duas bandas de

actividade proteolítica: uma banda tênue com peso molecular entre 50 e 80 kDa, e uma banda intensa com peso molecular entre 80 e 125 kDa. Quanto à actividade caseinolítica, parece haver uma inversão da intensidade das bandas de actividade, com uma banda mais tênue à altura de 80 a 120 kDa;

- 3) a máxima actividade inibitória, mediante a utilização de inibidores de proteases sobre as matrixinas aqui estudadas, foi obtida com as concentrações de 1 μ M de doxiciclina para *T. b. brucei*, e 5 mM de PMSF para *L. infantum*, nos zimogramas de actividade gelatinolítica.
- 4) nos zimogramas de actividade caseinolítica, a máxima actividade inibitória mediante a utilização de inibidores de proteases sobre as matrixinas aqui estudadas, foi obtida com recurso a doxiciclina, nas concentrações de 1 μ M para *T. b. brucei*, e 100 mM de PMSF para *L. infantum*;
- 5) o estudo bioinformático, utilizando como padrão a matrixina GP63, parece indicar um elevado grau de conservação desta protease entre os parasitas estudados, apesar da existência de alguma variabilidade das sequências lineares em torno da região catalítica, o que poderá explicar a promiscuidade das matrixinas em relação aos seus substratos.

6. Perspectivas Futuras

Research is an organized method for keeping you reasonably dissatisfied with what you have.

— Charles F. Kettering

Um trabalho de investigação não se encerra com o concluir de uma tese, de um curso ou de um estágio. As perguntas colocadas no início de uma pesquisa e que despertam a curiosidade científica do investigador podem apenas ser ampliadas no final de um trabalho, pois cada resposta leva a novas perguntas, e essas a outras mais, e por aí em diante.

Para o prosseguimento dos trabalhos aqui discutidos, seria interessante averiguar mais detalhadamente a relação entre metaloproteinases e processos de invasão parasitária, nomeadamente com a inclusão de outros parasitas agressivos – *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., *T. cruzi*, outras espécies de *Leishmania* – visto que em todas estas infecções, o balanço entre MMP e inibidores endógenos está desregulado a favor da proteólise activa. A inclusão destes parasitas não apenas nos protocolos experimentais de zimografia mas também no trabalho bioinformático poderá possivelmente levar à identificação e integração de elementos comuns nos processos de invasão e progressão parasitária. Por essa razão, a compreensão destas interacções permanece um desafio importante.

Similarmente, metodologias capazes de fornecer resultados mais abrangentes, por exemplo tecnologia de *microarrays* de DNA, poderiam ser muito vantajosas para observar as possíveis alterações de padrão de expressão de todas as metaloproteinases em diversos parasitas simultaneamente. Esta abordagem seria útil não apenas em termos comparativos como também poderia possivelmente fornecer indícios em relação à supracitada interacção entre hospedeiro e parasita no que se refere às metaloproteinases.

Igualmente interessante seria a exploração de inibidores naturais (por exemplo, derivados de plantas), pois a inibição das metaloproteinases é um tema com particular interesse, nomeadamente para a indústria farmacêutica. Numa época em que a cada dia são reveladas mais e mais propriedades medicinais de plantas ou extractos utilizados cultural e tradicionalmente, é importante utilizar estas informações e integrá-las, dentro do possível, numa indústria química onde a procura por fármacos mais eficientes, mais económicos e

mais seguros deve ser uma constante evidência. Em conjunto com técnicas de modelação estrutural, por exemplo, o aperfeiçoamento de inibidores selectivos de metaloproteinases-chave pode conduzir, senão a novos compostos terapêuticos, pelo menos a uma aproximação teórica que permita o desenho de novos protótipos vacinais.

7. Referências Bibliográficas

- Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. (2004) Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resistance Updates* 7:195–208
- Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, Yu YK. (2005) Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal*, 272:5101-5109
- Bangs JD, Ransom DA, Nimick M, Christie G, Hooper NM. (2001) In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Molecular & Biochemical Parasitology* 114:111–117
- Baral, TN. (2010) Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010
- Barbosa AP, Campos DMB, Semerene AR, Teixeira ARL, Santana JM. (2006) *Lagochilascaris minor* third-stage larvae secrete metalloproteases with specificity for fibrinogen and native collagen. *Microbes and Infection*, 8:2725-2732
- Barmina OY, Walling HW, Fiacco GJ, Freije JMP, López-Otín C, Jeffrey JJ, Partridge NC. (1999) Collagenase-3 Binds to a Specific Receptor and Requires the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein for Internalization. *The Journal of Biological Chemistry* 274(42):30087–30093
- Beattie L, Kaye PM. (2011) *Leishmania*–host interactions: what has imaging taught us? *Cellular Microbiology* 13(11):1659–1667
- Becker JW, Marcy AI, Rokosz LL, Axel MG, Burbaum JJ, Fitzgerald PMD, Cameron PM, Esser CK, Hagmann JD, Springer JP. (1995) Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sciences* 4(10):1966-1976
- Bellosta S, Baetta R, Canavesi M, Comparato C, Granata A, Monetti M, Cairoli F, Eberini I, Puglisi L, Corsini A. (2007) Raloxifene inhibits matrix metalloproteinases expression and activity in macrophages and smooth muscle cells. *Pharmacological Research* 56:160–167
- Berriman M *et al.* (2005) The Genome of African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309: 416-422.
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engle JA. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4(2):197–250
- Bisser S, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer ON, Toure FS, Taoufiq Z, Bouteille B, Buguet A, Mazier D. (2006) Harboursing in the brain: A focus on immune evasion mechanisms and

- their deleterious effects in malaria and human African trypanosomiasis. *International Journal of Parasitology* 36:529–540
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. (1999) Insights into MMP–TIMP Interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 878:73-91
- Borkakoti N. (1998) Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 70:73-94
- Bouvier J, Schneider P, Etges R, Bordier C. (1990) Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry* 29, 10113-10119
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477:267-283
- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. (2000) Interstitial Collagenases as Markers of Tumor Progression. *Clinical Cancer Research* 6:4823–4830
- Brittingham A, Chen G, Mcgwire BS, Chang KP, Mosser DM. (1999) Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infection and Immunity* 67(9):4477–4484
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DS. (1995) Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology* 155(6):3102–3111
- Brul S *et al.*, (1997) The antifungal activity of 1-10-o-phenanthroline and EDTA is mediated through zinc chelations and involves cell wall construction. *Food Technology and Biotechnology* 35(4):267-274
- Buttler GS, Overall CM (2009) Updated Biological Roles for Matrix Metalloproteinases and New “Intracellular” Substrates Revealed by Degradomics. *Biochemistry* 48(46):10830–10845
- Button LL, Wilson G, Astell CR, McMaster WR. (1993) Recombinant *Leishmania* surface glycoprotein GP63 is secreted in the baculovirus expression system as a latent metalloproteinase. *Gene* 134:75-81
- Cai KQ, Yang WL, Capo-Chichi CD, Vanderveer L, Wu H, Godwin AK, Xu XX. (2007) Prominent expression of metalloproteinases in early stages of ovarian tumorigenesis. *Molecular Carcinogenesis* 46(2):130-43
- Cao J, Zucker S. (2013) Biology and chemistry of matrix metalloproteinases (MMPs), disponível em <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11034>, consultada a 29/01/2013.
- Castro HC, Abreu PA, Geraldo RB, Martins RCA, Santos R, Loureiro NIV, Cabral LM, Rodrigues CR. (2011a) Looking at the proteases from a simple perspective. *Journal of Molecular Recognition* 24:165–181

- Castro MM, Kandasamy AD, Youssef N, Schulz R. (2011) Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: Therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Pharmacological Research* 64:551– 560
- Cawston TE. (1996) Metalloproteinase Inhibitors and the Prevention of Connective Tissue Breakdown. *Pharmacological Therapy* 70(3):163-182
- Chakraborti S, Mandal M, Das M, Mandal A, Chakraborti T. (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry* 253(1-2):269–285
- Chang YC, Yang SF, Hsieh YS. (2001) Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell cultures. *Journal of Endodontics* 27(11):679-82
- Chang C, Werb Z. (2011) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology* 11:S37-S43
- Cheng S, Lovett DH. (2003) Gelatinase A (MMP-2) Is Necessary and Sufficient for Renal Tubular Cell Epithelial-Mesenchymal Transformation. *American Journal of Pathology* 162(6):1937-1942
- Cheng XC, Wang Q, Fang H, Xu WF. (2008) Advances in Matrix Metalloproteinase Inhibitors Based on Pyrrolidine Scaffold. *Current Medicinal Chemistry* 15(4):374-385
- Colombo FA, Odorizzi RMFN, Laurenti MD, Galati EAB, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. (2011) Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research* 109:267–274
- Costa JD, Nogueira de Melo AC, Vermelho AB, Meirelles MN, Porrozzi R. (2008) In vitro evidence for metallopeptidase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages. *Acta Tropica* 106:175–183
- Cox FEG. (1996) The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. London: The Wellcome Trust, pp. 206–217. ISBN 1-869835-86-7
- Cuervo P, Santos ALS, Alves CR, Menezes GC, Silva BA, Britto C, Fernandes O, Cupolillo E, De Jesus JB. (2008) Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Acta Tropica* 106:143–148
- Curran S, Murray GI. (2000) Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *European Journal of Cancer*. 36(13 Spec No):1621-30
- Cvetkovick A, Menon AL, Thorgersen MP, Scott JW, Poole II FL, Jenney Jr FE, Lancaster WA, Praissman JL, Shanmukh S, Vaccaro BJ, Trauger SA, Kalisiak E, Apon JV, Siuzdak G, Yannone SM, Tainer JA, Adams MW. (2010) Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature* 466:5
- Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MJ, Balkwill FR. (1993) A synthetic mmp inhibitor decrease tumor burden and prolongues survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenographts. *Cancer research* 53:15, 3652

- De Atouguia J, Kennedy PGE. (2000) Neurological aspects of human African trypanosomiasis. *In: Infectious diseases of the nervous system* (Davis LE e Kennedy PGE, eds). Butterworth-Heinemann, Oxford, Reino Unido, pp 321–372
- De Sousa KP, Atouguia J, Silva MS. (2010) Partial Biochemical Characterization of a Metalloproteinase from the Bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* parasites. *Protein Journal* 29:283-289
- De Sousa KP, Atouguia J, Silva MS. (2011) Induced cytokine network during experimental African trypanosomiasis. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* 3:71–78
- De Sousa KP, Lança ASC, Atouguia J, Távira LT, Silva MS. (2009) Caracterização bioquímica de metaloproteinases na forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*. *Acta Parasitológica Portuguesa* 16(1-2):138-139
- Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R. (2000) Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1478:51–60
- Despommier DD, Gwadz RW, Hotez PJ, Knirsch CA. (eds.) (2005) *In: Parasitic Diseases*, 5th edition. Apple Trees Productions Llc, ISBN 0-9700027-7-7
- Devel L, Czarny B, Beau F, Georgiadis D, Stura E, Dive V. (2010) Third generation of matrix metalloprotease inhibitors: Gain in selectivity by targeting the depth of the S1' cavity. *Biochimie* 92:1501-1508
- Donelson JE, Hill KL, El-Sayed NML. (1998) Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91(1):51–66
- Douzery EJ, Snell EA, Baptiste E, Delsuc F, Philippe H. (2004) The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 101:15386–15391
- Drennan MB, Stijlemans B, Van Den Abbeele J, Quesniaux VJ, Barkhuizen M, Brombacher F, De Baetselier P, Ryffel B, Magez S. (2005) The Induction of a Type 1 Immune Response following a *Trypanosoma brucei* Infection Is MyD88 Dependent. *The Journal of Immunology* 175:2501–2509
- Dumas M, Bouteille B. (1997) Current status of trypanosomiasis. *Medécine Tropicale (Mars)* 57(S3):65-9
- El-Sayed NM, *et al.* (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309:404–409
- El-Sayed NMA, Donelson JE. (1997) African Trypanosomes Have Differentially Expressed Genes Encoding Homologues of the *Leishmania* GP63 Surface Protease. *The Journal of Biological chemistry* 272(42):26742–26748
- Enanga B, Burchmore RJS, Stewart ML, Barrett MP. (2002) Sleeping sickness and the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:845–858

- Fernandez-Resa P, Mira E, Quesada AR. (1995) Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Analytical Biochemistry* 224:434–435.
- Frisch SM, Werb Z. (1989) Molecular biology of collagen degradation. *In* Collagen: Molecular Biology (Olsen BR e Nimni ME, eds) Vol. IV, pp. 85-108, CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos da América.
- Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. (2001) Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* 91:822–832
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH. (1994) Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature*, 370:555–7
- Geurts N, Opdenakker G, Van Den Steen PE. (2012) Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology and Therapeutics* 133(3):257–279
- Gillespie SH, Pearson RD, eds. (2001) *In: Principles and Practice of Clinical Parasitology*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, Reino Unido. ISBN 0-471-97729-2
- Gogly B, Groult N, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B. (1998) Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Analytical Biochemistry* 255:211–216
- Golub LM. (2011) Introduction and background. *Pharmacological Research* 63:99–101
- Gonçalves DJD. (2011) Efeito da Minociclina em *Mus musculus* infectados com *Trypanosoma brucei brucei*. Universidade Nova de Lisboa
- Gorman JL, Ispanovic E, Haas TL. (2011) Regulation of matrix metalloproteinase expression. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 8(1):5–11
- Grandgenett PM, Otsu K, Wilson HR, Wilson ME, Donelson JE. (2007) A Function for a Specific Zinc Metalloprotease of African Trypanosomes. *PLoS Pathogens* 3(10):e150
- Gross J, Lapiere CM (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 48(6):1014-1022
- Guiliano DB, Hong X, McKerrow JH, Blaxter ML, Oksov Y, Liu J, Ghedin E, Lustigman S. (2004) A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling. *Molecular and Biochemical Parasitology* 136(2):227–242
- Hainard A, Tiberti N, Robin X *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule 1 are powerful staging markers for human African trypanosomiasis. (2011) *Tropical Medicine and International Health* 16(1):119–126
- Hames BD, ed. (2002) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Oxford University Press, Nova York, Estados Unidos da América. ISBN: 0-19-963641-9

- Hamm S, Dehouck B, Kraus B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Risau W, Cecchelli R, Engelhardt B, Dehouck MP. (2004) Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res* 315(2):157–166
- Hanania R, Sun HS, Xu K, Pustynnik S, Jeganathan S, Harrison RE. (2012) Classically Activated Macrophages Use Stable Microtubules for Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Secretion. *Journal Biological Chemistry* 287(11):8468-8483
- Hawkes SP, H Li, Taniguchi GT. (2010) Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs,. *In: Matrix Metalloproteinases Protocols* (Clark I, ed.), Humana Press, Totowa, Estados Unidos da América. pp 399-410
- Henderson B, Davies DE. (1991) The design of inhibitors of cartilage breakdown. Osteoarthritis: research and prospects for pharmacological intervention. *In: Pharmacology and Therapy – Past and Future* (Russell RGG, ed.) VCH, Inc., pp. 203-215
- Heussen C, Dowdle EB. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry* 102:196–202
- Hidalgo M, Eckhardt SG. (2001) Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 93(3):178–93
- Himelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ. (1995) Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis*. 14(1-6):246-58
- Hu X, Beeton C. (2010) Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Journal of Visualized Experiments*, 45
- Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. (2011) Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(23):3853-68
- Ilg T, Harbecke D, Overath P. (1993) The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS Lett* 327:103-107
- Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fuji Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. (1996) Membrane-Type Matrix Metalloproteinase 1 Is a Gelatinolytic Enzyme and Is Secreted in a Complex with Tissue Inhibitor of Metalloproteinases. *Cancer Research* 56:2707-2710
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, *et al.* (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309(5733):436-442
- Jacobsen JA, Jourden JLM, Miller MT, Cohen SM. (2010) To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803:72–94

- Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion. Cellular and Molecular Life Sciences 57(1):5-15.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. (2010) Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. Cell 141(1):52–67.
- Klein T, Bischoff R. (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. Amino Acids 41:271–290
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. Analytical Biochemistry 218(2):325-9
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 43(Suppl):S42-S51
- Klemba M, Goldberg DE. (2002) Biological roles of proteases in parasitic protozoa. Annual Reviews in Biochemistry 71:275–305
- Kristensson K, Nygård M, Bertini G, Bentivoglio M. (2010) African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. Progress in Neurobiology 91(2):152–171
- Krizkova S, Zitka O, Masarik M, Adam V, Stiborova M, Eckschlager T, Chavis GJ, Kizek R. (2011) Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. Trends in Analytical Chemistry 30(11):1819–1832
- Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. (2010) Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 61:205–209
- LaCount DJ, Gruszynski AE, Grandgenett PM, Bangs JD, Donelson JE. (2003) Expression and Function of the *Trypanosoma brucei* Major Surface Protease (GP63) Genes. Journal of Biological Chemistry 278(27):24658–24664
- Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. (2004) TIMPs as multifacial proteins. Critical Reviews in Oncology/Hematology 49:187–198
- Lança ASC, De Sousa KP, Atouguia J, Prazeres DM, Monteiro GA, Silva MS. (2011) *Trypanosoma brucei*: Immunization with plasmid DNA encoding invariant surface glycoprotein gene is able to induce partial protection in experimental African trypanosomiasis. Experimental Parasitology, 18-24.
- Lanham SM, Godfrey DG. (1970) Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. Experimental Parasitology 28:521–534
- Lapiere CH, Gross J. (1963) Animal collagenase and collagen metabolism. In: Mechanisms of Hard Tissue Destruction. (Sognnaes RF, ed.) American Association for the Advancement of Science, Washington D. C., Estados Unidos da América, pp663
- Lauhio A, Konttinen YT, Tschesche H, Nordström D, Sale T, Lhdevirta J, Golub LM, Sorsa T. (1994) Reduction of matrix metalloproteinase 8-neutrophil collagenase levels during

- long-term doxycycline treatment of reactive arthritis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 38:400-402
- Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL. (2001) Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Research Reviews* 36:249–57.
- Lindner-Olsson E, Chatzissavidou N, Lüllau E. (eds.) (2001) *Animal Cell Technology: From Target to Market. Proceedings of the 17th ESACT Meeting Tylösand, Sweden. Series: ESACT Proceedings Vol. 1*, pp 227-229. ISBN 978-1-4020-0264-9
- Liu J, Xiong W, Baca-Regen L, Nagase H, Baxter BT. (2003) Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *Journal of Vascular Surgery* 38(6):1376-1383
- Lombard C, Saulnier J, Wallach J. (2005) Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie* 87:265–272
- Lonsdale-Eccles JD, Grab DJ. (2002) Trypanosome hydrolases and the blood–brain barrier. *Trends in Parasitology* 18(1):17-19
- Lutje V, Seixas J, Kennedy A. (2010) Chemotherapy for second-stage Human African trypanosomiasis (Review). *The Cochrane Library* 2010(8), JohnWiley & Sons, Ltd.
- Ma L, Chen K, Meng Q, Liu Q, Tang P, Hu S, Yu J. (2011) An evolutionary analysis of trypanosomatid GP63 proteases. *Parasitology Research* 109:1075–1084
- MacDonald MH, Morrison CJ, McMaster WR. (1995) Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63. *Biochimica et Biophysica Acta* 1253(2):199-207
- Marangoni NR, Melo GD, Moraes OC, Souza MS, Perri SHV, Machado GF. (2011) Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* 33:330–334
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH. (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* 39(D):225-9
- Maret W. (2009) Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics* 2:117–125
- Maretti-Mira AC, de Pinho Rodrigues KM, de Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Craft N. (2011) MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Tropica* 119(2-3):160-4.
- Masocha W, Kristensson K. (2012) Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence* 3(2):202–212

- Masocha W, Rottenberg ME, Kristensson K. (2006) Minocycline Impedes African Trypanosome Invasion in the brain of the murine model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50(5):1798-804
- Masocha W, Rottenberg ME, Kristensson K. (2007) Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier. *Physiology and Behavior* 92:110–114
- Masson V, de la Ballina LR, Munaut C, Wielockx B, Jost M, Maillard C, Blacher S, Bajou K, Itoh T, Itohara S, Werb Z, Libert C, Foidart JM, Noël A. (2005) Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB Journal* 19(2):234-6
- Matrisian LM. (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14(7):455-463
- Matthews KR, Ellis JR, Paterou A. (2004) Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends in Parasitology*, 20(1):40–47
- Matusiak N, van Waarde A, Bischoff R, Oltenfreiter R, van de Wiele C, Dierckx RA, Elsinga PH. (2013) Probes for non-invasive matrix metalloproteinase-targeted imaging with PET and SPECT. *Current Pharmaceutical Design*. [Epub ahead of print]
- Mauviel A. (1993) Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry* 53(4):288-295
- McKelvey JJ. (1973) *Man against Tsetse: Struggle for Africa*. Cornell University Press, Londres, Reino Unido. ISBN: 9780801407680
- Morrison CJ, Butler GS, Rodríguez D, Overall CM. (2009) Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Current Opinion in Cell Biology* 21:645–653
- Mulenga C, Mhlanga JD, Kristensson K, Robertson B (2001) *Trypanosoma brucei brucei* crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 27(1):77–85.
- Mungall BA, Pollitt CC. (2001) In situ zymography: topographical considerations. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 47:169–176
- Munge BS, Fisher J, Millord LN, Krause CE, Dowd RS, Rusling JF. (2010) Sensitive electrochemical immunosensor for matrix metalloproteinase-3 based on single-wall carbon nanotubes. *Analyst* 135:1345-1350
- Mutluay AT, Agee KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Thompson JM, McCracken CE, Looney SW, Tay FR, Pashley DH. (2011) Inhibition of MMPs by alcohols. *Dental Materials* 27:926–933
- Nikolskaia OV, Lima APCA, Kim YV, Lonsdale-Eccles JD, Fukuma T, Scharfstein J, Grab DJ. (2006) Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *Journal of Clinical Investigation* 116:2739–2747

- Noble JE, Bailey MJA. (2009) Chapter 8: Quantitation of Protein. *In: Methods in Enzymology* (Richard RB, Murray PD, eds.), Vol 463:73-95. Academic Press, doi:10.1016/S0076-6879(09)63008-1
- Noël A, Gutiérrez-Fernández A, Sounni NE, Behrendt N, Maquoi E, Lund IK, Cal S, Hoyer-Hansen G, López-Otín C. (2012) New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Frontiers in Pharmacology* 3:140
- Nwagwu M, Okenu DMN, Olusi TA, Molokwu RI. (1988) *Trypanosoma brucei* releases proteases extracellularly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82(4):577
- Owen CA, Hu Z, Barrick B, Shapiro SD (2003). Inducible Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases–Resistant Matrix Metalloproteinase-9 on the Cell Surface of Neutrophils. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 29(3):283-294
- Parks WC. (1999) Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair and Regeneration* 7(6):423–432
- Passero, LFD. (2011) Avaliação da resposta imune desencadeada por antígenos protéicos isolados de *Leishmania (Viannia) shawi*. Universidade de São Paulo
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbintowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF and Berriman M. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics* 39(7):839-47
- Pentreath VW, Owolabi AO, Doua F. (1992) Survival of *Trypanosoma brucei brucei* in cerebrospinal fluid. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 86(1):29–34.
- Pirard B. (2007) Insight into the structural determinants for selective inhibition of matrix metalloproteinases. *Drug Discovery Today* 12(15/16)
- Poltera AA, Mann AH, Rudin W, Lambert PH. (1980) *Trypanosoma brucei brucei*: a model for cerebral trypanosomiasis in mice an immunological, histological and electron microscopic study. *Clin. exp. Immunol.* 40(3):496-507
- Ramu P, Lobo LA, Kukkonen M, Bjun E, Suomalainen M, Raukola H, Miettinen M, Julkunen I, Holst O, Rhen M, Korhonen TK, Lahteenma K. (2007) Activation of pro-matrixmetalloproteinase-9 and degradation of gelatin by the surface protease PgtE of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* I. *J. Med. Microbiol.* 298, 263–278.
- Rasmussen FH, Yeung N, Kiefer L, Murphy G, Lopez-Otin C, Vitek MP, Moss ML. (2004) Use of a multiple-enzyme/multiple-reagent assay system to quantify activity

- levels in samples containing mixtures of matrix metalloproteinases. *Biochemistry* 43(11):2987-2995
- Roberts SC, Wilson ME, Donelson JE. (1995) Developmentally regulated expression of a novel 59-kDa product of the major surface protease (Msp or gp63) gene family of *Leishmania chagasi*. *Journal of Biological Chemistry* 270(15):8884–8892.
- Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovskiy T, Rath M, Nniedzwiecki A. (2010) *In vitro* modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Oncology Reports* 23:605-614
- Rosa R, Rodrigues OR, Marques C, Santos-Gomes GM. (2005) *Leishmania infantum*: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. *Experimental Parasitology* 109(2):106–114
- Rosenberg GA. (2009) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurology* 8(2):205-16
- Ryan ME, Ashley RA. (1998) How do tetracyclines work? *Advances in Dental Research* 12(2):149–151
- Saarialho-Kere UK, Kovacs SO, Pentland AP, Olerud JE, Welgus HG, Parks WC. (1993) Cell-Matrix Interactions Modulate Interstitial Collagenase Expression by Human Keratinocytes Actively Involved in Wound Healing. *Journal of Clinical Investigation* 92(6):2858-2866
- Sandberg H, Lütkemeyer D, Kuprin S, Wrangel M, Almstedt A, Persson P, Ek V, Mikaelsson M. (2006) Mapping and partial characterization of proteases expressed by a CHO production cell line. *Biotechnology and Bioengineering* 95(5):961-71
- Santos ALS, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM. (2006) The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78(4): 687-714
- Sapadin AN, Fleishchmajer R. (2006) Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. *Journal of the American Academy of Dermatology* 54(2):258–265
- Sengupta N, MacDonald TT. (2007) The Role of Matrix Metalloproteinases in Stromal/Epithelial Interactions in the Gut. *Physiology (Bethesda)* 22:401-409
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. (1993) Cloning and Characterization of a Unique Elastolytic Metalloproteinase Produced by Human Alveolar Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 268(32):23824-23829
- Silva M, Prazeres D, Lança ASC, Atouguia J, Monteiro G. (2009) Trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* as a potential target for DNA vaccine development against African trypanosomiasis. *Parasitology Research* 105(5):1223-1229
- Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. (2001) Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across

- the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Cell Biology* 153(5):933-946]
- Snoek-van Beurden PAM, Von den Hoff JW. (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 38:73-83
- Solomon A, Akabayov B, Frenkel A, Milla ME, Sagi I. (2007) Key feature of the catalytic cycle of TNF- α converting enzyme involves communication between distal protein sites and the enzyme catalytic core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104(12):4931–4936
- Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mäntylä P. (2006) Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine* 38(5):306-21
- Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H. (1989) Human Fibroblast Collagenase-a-Macroglobulin Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 264(1):393-401
- Sternlicht MD, Werb Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* 17:463–516
- Sun QY, Li M, Yang FM. (2007) Purification and Characterization of a Metalloproteinase with Weak Fibrinogenolytic Activity from *Naja atra* Venom. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 23(10):83-843.
- Szabo KA, Ablin RJ, Singh C. (2004) Matrix metalloproteinases and the immune response. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4:295–319
- Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. (2010) Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803(1):20–28
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10):2731-2739.
- Tate P, God J, Bibb R, Lu Q, Larcom LL. (2004) Inhibition of metalloproteinase activity by fruit extracts. *Cancer Letters* 212(2):153–158
- Tizard I, Nielsen KH, Seed R, Hall JE. (1978) Biologically Active Products from African Trypanosomes. *Microbiological Reviews* 42(4):661-681
- Vaalamo M. (2000) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in normal and aberrant wound repair. University of Helsinki
- Vaday GG, HersHKoviz R, Rahat MA, Lahat N, Cahalon L, Lider O. (2000) Fibronectin-bound TNF-alpha stimulates monocyte matrix metalloproteinase-9 expression and regulates chemotaxis. *Journal of Leukocyte Biology* 68(5):737–47.
- Verma RP, Hansch C. (2007) Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15:2223–2268

- Vincendeau P, Bouteille B (2006) Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78:645–665
- Viswambharan H, Seebeck T, Yang Z. (2003) Enhanced endothelial nitric oxide-synthase activity in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *International Journal for Parasitology* 33(10): 1099–1104
- Voth BR, Kelly BL, Joshi PB, Ivens AC, McMaster WR. (1998) Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Molecular and Biochemical Parasitology* 93(1):31–41
- Weissleder R, Tung CH, Mahmood U, Bogdanov A. (1999) In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nature Biotechnology* 17:375
- Welgus HG, Senior RM, Parks WC, Kahn AJ, Ley TJ, Shapiro SD, Campbell EJ. (1992) Neutral proteinase expression by human mononuclear phagocytes: a prominent role of cellular differentiation. *Matrix Suppl.* 1:363-367
- Whittaker M, Floyd CD, Brown P, Gearing AJ. (1999) Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* 99(9):2735-2776
- Williamson AL, Lecchi P, Turk BE, Choe Y, Hotez PJ, McKerrow JH, Cantley LC, Sajid M, Craik CS, Louka A. (2004) A Multi-enzyme Cascade of Hemoglobin Proteolysis in the Intestine of Blood-feeding Hookworms. *Journal of Biological Chemistry* 279(34):35950–35957
- Williamson RA, Marston FA, Angal S. (1990) Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochemistry Journal* 268(2):267–274
- Woessner JF, Nagase H, eds. (2000) *In: Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, ISBN 0–19-850268-0 35.00
- Woessner JF. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling, *FASEB Journal*. 5(8):2145-2154
- Yan L, Zucker S, Toole BT. (2005) Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thrombosis and Haemostasis* 93(2):199-204
- Yan SJ, Blomme EA. (2003) *In situ* zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. *Veterinary Pathology* 40(3):227–236
- Yang BZ, Zhao H, Kranzler HR, Gelernter J. (2005) Characterization of a likelihood based method and effects of markers informativeness in evaluation of admixture and population group assignment. *BMC Genetics* 6:50.
- Yang Z, Strickland DK, Bornstein P. (2001) Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *Journal of Biological Chemistry* 276(11):8403-8408.

- Yao C, Donelson JE, Wilson ME. (2003) The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology* 132(1):1–16
- Yao C. (2010) Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infection and Immunity* 78(1):22–31
- Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. (1998) Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends in Neurosciences* 21(2):75–80
- Yurdakul P. (2005) Immunopathogenesis of *Leishmania* infections. *Mykrobiol Bul* 39(3):363-381
- Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J. (1998) Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova* 21(6)
- Zhai Y, Hotary KB, Nan B, Bosch FX, Muñoz N, Weiss SJ, Cho KR. (2005) Expression of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Is Associated with Cervical Carcinoma Progression and Invasion. *Cancer Research* 65(15):6543-6550
- Zhou H, Bernhard EJ, Fox FE, Billings PC. (1993) Induction of metalloproteinase activity in human T-lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1177(2):174-8.
- Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, Boyd D, Nicolson G, Montana S. (1999) Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues: Clinical and experimental applications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 878:212-27

Referências Eletrônicas:

- EMBC - embc.embo.org
- GenBank - ncbi.nlm.nih.gov/genbank
- IUBMB - iubmb.org
- Lousiana State University Studyblue - studyblue.com
- MEROPS - merops.sanger.ac.uk
- NCBI - ncbi.nlm.nih.gov
- OMS – who.org
- PDB - wwpdb.org
- Sciencephotolibrary - sciencephoto.com
- SwissProt - uniprot.org

Anexos

Anexo 1:

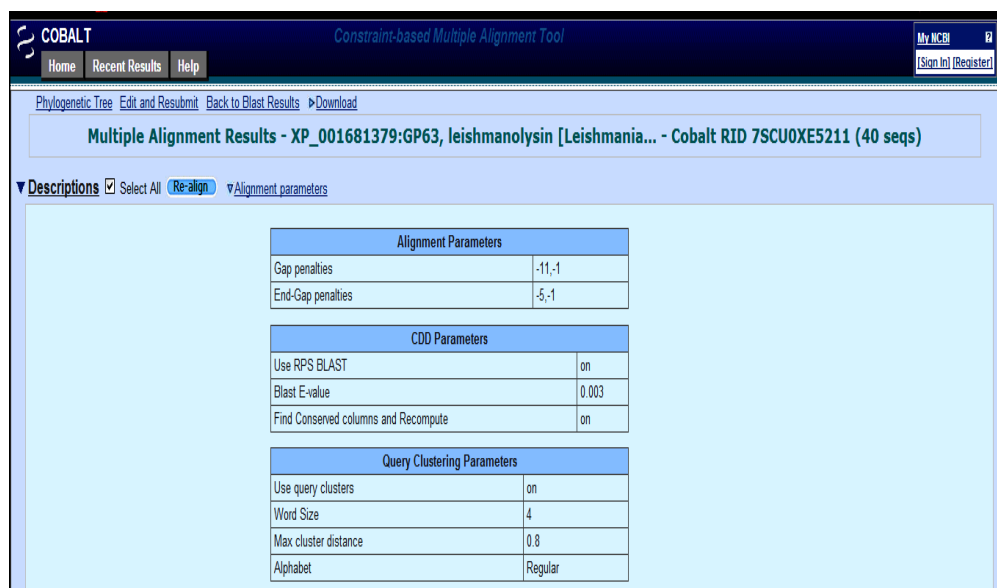
Referências das sequências utilizadas para o processamento bioinformático.

reference>gi|157865343|ref|XP_001681379.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania major strain Friedlin]
lcl|48749>gi|157865339|ref|XP_001681377.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania major strain Friedlin]
lcl|48750>gi|157865341|ref|XP_001681378.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania major strain Friedlin]
lcl|48751>gi|157865337|ref|XP_001681376.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania major strain Friedlin]
lcl|48752>gi|70803027|gb|AAZ12931.1| major surface protease gp63, putative [Trypanosoma brucei
brucei strain 927/4 GUTat10.1]
lcl|48753>gi|70803025|gb|AAZ12929.1| major surface protease gp63, putative [Trypanosoma brucei
brucei strain 927/4 GUTat10.1]
lcl|48754>gi|70803028|gb|AAZ12932.1| major surface protease gp63, putative [Trypanosoma brucei
brucei strain 927/4 GUTat10.1]
lcl|48755>gi|72392395|ref|XP_846998.1| major surface protease gp63 [Trypanosoma brucei brucei strain
927/4 GUTat10.1]
lcl|48756>gi|72392391|ref|XP_846996.1| major surface protease gp63 [Trypanosoma brucei brucei strain
927/4 GUTat10.1]
lcl|48757>gi|71755809|ref|XP_828819.1| major surface protease A [Trypanosoma brucei brucei strain
927/4 GUTat10.1]
lcl|48758>gi|72392393|ref|XP_846997.1| major surface protease gp63 [Trypanosoma brucei brucei strain
927/4 GUTat10.1]
lcl|48759>gi|72392389|ref|XP_846995.1| major surface protease gp63 [Trypanosoma brucei brucei strain
927/4 GUTat10.1]
lcl|48760>gi|71756043|ref|XP_828936.1| major surface protease Gp63 [Trypanosoma brucei brucei strain
927/4 GUTat10.1]
lcl|48761>gi|71746880|ref|XP_822495.1| major surface protease GP63 [Trypanosoma brucei brucei strain
927/4 GUTat10.1]
lcl|48762>gi|321399015|emb|CAM66064.2| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
lcl|48763>gi|321399013|emb|CAM66068.2| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
lcl|48764>gi|321399011|emb|CAM66066.2| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
lcl|48765>gi|134067787|emb|CAM66067.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
lcl|48766>gi|68124675|emb|CAJ02591.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania major strain Friedlin]
lcl|48767>gi|68124673|emb|CAJ02588.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania major strain Friedlin]
lcl|48768>gi|321399012|emb|CBZ08391.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
lcl|48769>gi|68124674|emb|CAJ02589.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania major strain Friedlin]
lcl|48770>gi|68124672|emb|CAJ02586.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania major strain Friedlin]

lcl|48771>gi|339897013|ref|XP_001463697.2| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
 lcl|48772>gi|339897009|ref|XP_001463701.2| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
 lcl|48773>gi|339897005|ref|XP_001463699.2| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
 lcl|48774>gi|339897007|ref|XP_003392249.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
 lcl|48775>gi|146079131|ref|XP_001463700.1| GP63, leishmanolysin [Leishmania infantum JPCM5]
 lcl|48776>gi|259011719|gb|ACL01096.2| GP63 [Leishmania major]
 lcl|48777>gi|2761012|gb|AAC39120.1| leishmanolysin [Leishmania major]
 lcl|48778>gi|71649206|ref|XP_813343.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48779>gi|71424023|ref|XP_812653.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48780>gi|71418357|ref|XP_810828.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48781>gi|71416296|ref|XP_810184.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48782>gi|71416183|ref|XP_810132.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48783>gi|71413695|ref|XP_808977.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48784>gi|71407496|ref|XP_806213.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48785>gi|71406046|ref|XP_805593.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48786>gi|71403182|ref|XP_804418.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
 lcl|48787>gi|71402215|ref|XP_804047.1| surface protease GP63 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]

Anexo 2:

Configurações utilizadas no *software* COBALT para o processamento das sequências de interesse através do alinhamento múltiplo.



The screenshot displays the COBALT web interface. The title bar reads "COBALT Constraint-based Multiple Alignment Tool". Navigation links include "Home", "Recent Results", "Help", "Phylogenetic Tree", "Edit and Resubmit", "Back to Blast Results", and "Download". A user login area shows "My MCB" and "Sign In (Register)". The main heading is "Multiple Alignment Results - XP_001681379:GP63, leishmanolysin [Leishmania... - Cobalt RID 7SCU0XE5211 (40 seqs)". Below this, there are tabs for "Descriptions" (selected), "Select All", "Re-align", and "Alignment parameters". The "Alignment parameters" section contains three tables of settings.

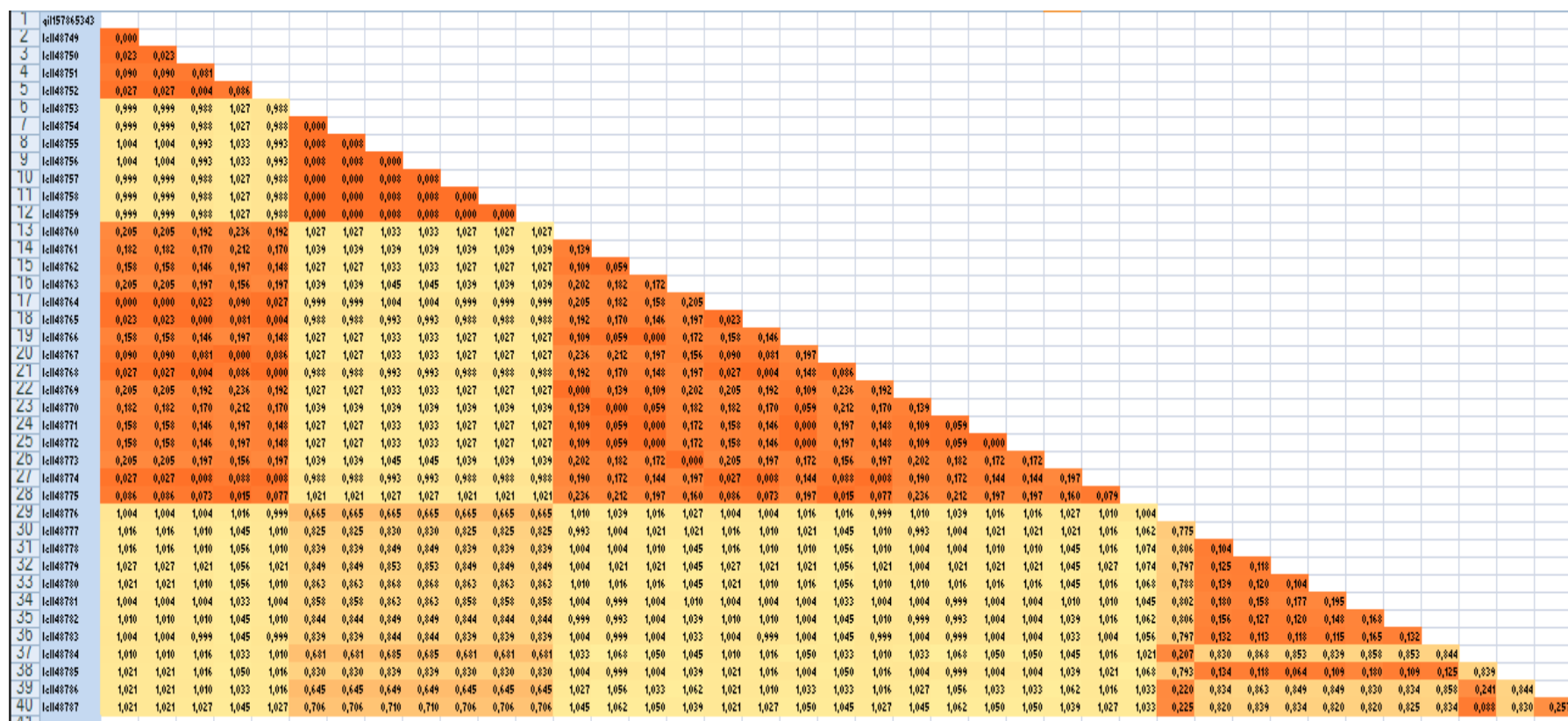
Alignment Parameters	
Gap penalties	-11,-1
End-Gap penalties	-5,-1

CDD Parameters	
Use RPS BLAST	on
Blast E-value	0.003
Find Conserved columns and Recompute	on

Query Clustering Parameters	
Use query clusters	on
Word Size	4
Max cluster distance	0.8
Alphabet	Regular

Anexo 3:

Estimativa da divergência evolucionária entre as sequências utilizadas para processamento bioinformático.



Estimação da divergência evolucionária entre as sequências utilizadas para análise bioinformática, por consideração da taxa de substituição de aminoácidos. A análise foi exectuada tendo como base o modelo corrigido de Poisson, com eliminação de todas as posições contendo *gaps*, utilizando o *software* MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).